REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LÖSLICHEN HYDROGENASE VON ALCALIGENES EUTROPHUS H 16

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Klaus Schneider
aus Naumburg/Saale

Göttingen 1975

REINIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG DER LÖSLICHEN HYDROGENASE VON ALCALIGENES EUTROPHUS H 16

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von

Klaus Schneider
aus Naumburg/Saale

Göttingen 1975

Diese Arbeit wurde im Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen durchgeführt.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

D 7

Referent: Prof. Dr. H. G. Schlegel

Korreferent: Prof. Dr. H. J. Knackmuss

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.1975

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
EINLEITUNG		1
METHODEN		4
EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE		29
A.	Vergleichende Untersuchungen an den Hydrogenasen verschiedener Knallgasbakterienstämme	29
I.	Die Hydrogenasen der Stämme Paracoccus denitrificans, Pseudomonas facilis, Corynebacterium autotrophicum 7c und C.autotrophicum 14g	30
1.	Aktivität der Hydrogenasen im zellfreien Extrakt	30
1.1.	Methylenblaureduktion: H_2-Aufnahmeraten und Reaktionskinetiken	30
1.2.	Knallgasreaktion: H_2-Oxidation durch molekularen Sauerstoff	33
1.3.	Versuche zum Nachweis pyridinnucleotidreduzierender Aktivität	34
1.4.	Energieabhängige NAD-Reduktion und rückläufiger Elektronentransport	36
2.	Lokalisierung der Hydrogenasen	38
2.1.	Aktivitätsverteilung der Hydrogenasen im Vergleich mit Indikatorenzymen	39
2.2.	Einfluß milder Zellaufschlußmethoden auf Enzymausbeute und Aktivitätsverteilung	42
2.3.	Verteilung der Hydrogenaseaktivität im diskontinuierlichen Saccharosedichtegradienten	45
2.3.1.	C.autotrophicum 7c	45
2.3.2.	P.facilis	51

		Seite
3.	Stabilität der Hydrogenasen	55
II.	Die Hydrogenase der Alcaligenes eutrophus-Stämme H16, B19, N9A und G27	55
1.	Nachweis einer partikelgebundenen und einer löslichen Hydrogenase	55
2.	Eigenschaften der löslichen Hydrogenasen	57
2.1.	NAD- und Methylenblaureduktion: Vergleich ihrer Reduktionsraten und Reaktionskinetiken	57
2.2.	Stabilität der Enzyme	59
3.	Aktivität und Stabilität der partikelgebundenen Hydrogenasen	61
B.	Stabilisierung, Reinigung und Charakterisierung der löslichen Hydrogenase von Alcaligenes eutrophus H16	62
1.	Stabilisierung der Hydrogenase	62
1.1.	Ermittlung optimaler Zellaufschlußbedingungen	62
1.2.	Aktivität und Stabilität der Hydrogenase nach Gelfiltration des Rohextrakts auf Sephadex G-25	64
1.3.	Abhängigkeit der Stabilität von pH-Wert und Puffersystem	65
1.4.	Einfluß potentiell stabilisierender Verbindungen	65
1.5.	Stabilitätsverhalten des oxidierten und reduzierten Enzyms	66
1.6.	Stabilitätsoptimum der gereinigten Hydrogenase	69
2.	Reinigung der Hydrogenase	69
2.1.	CTAB-Fällung und Ammoniumsulfatfraktionierung	70
2.2.	DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie	71
2.3.	Sephadex G-200-Gelfiltration	71
2.4.	Chromatographie an Hydroxylapatit	73

Seite

2.5. Gelelektrophoretische Reinheitsanalyse der angereicherten Hydrogenase 77
2.6. Nachweis von Hydrogenaseaktivitätsbanden im Polyacrylamidgel 79

3. Charakterisierung der gereinigten Hydrogenase 80
3.1. Zeitlicher Reaktionsverlauf der NAD-Reduktion 80
3.1.1. Charakterisierung der Anlaufphase 83
3.1.2. Ursachen für die frühzeitige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit 86
3.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration 88
3.3. pH-Optimum 89
3.4. Temperaturoptimum und Aktivierungsenergie (ΔH) 89
3.5. Einfluß hoher Salzkonzentrationen auf die Enzymaktivität 91
3.6. Abhängigkeit des Aktivitätsoptimums vom Puffersystem 92
3.7. Wirkung von Cofaktoren auf die Reaktionsgeschwindigkeit 93
3.8. Substratsättigungen der Hydrogenase 98
3.8.1. NAD- und H_2-Sättigung des oxidierten und reduzierten Enzyms 98
3.8.2. Erzeugung negativer Kooperativität 103
3.8.3. NAD-Sättigungskinetik bei verschiedenen H_2-Konzentrationen 106
3.8.4. H_2-Sättigungskinetik bei verschiedenen NAD-Konzentrationen 107
3.8.5. NAD- und H_2-Sättigung in Gegenwart von ATP und FMN 110
3.9. Wasserstoffacceptoren der Hydrogenase 110
3.9.1. Reduktion physiologischer und künstlicher H-Acceptoren in Gegenwart von NAD(H) 110
3.9.2. Versuche zum Nachweis der Fähigkeit der Hydrogenase, mit einer Vielzahl von H-Acceptoren direkt reagieren zu können 114

Seite

3.9.3 Nachweis einer Diaphoraseaktivität mit dem Präparat der hochgereinigten Hydrogenase 117
3.10. Reversibilität der NAD-Reduktion und H_2-Entwicklung 123
3.11. Spektrale Eigenschaften der Hydrogenase 126
3.11.1. Absorptionsspektrum des oxidierten und reduzierten Enzyms 126
3.11.2. Nachweis einer Flavinkomponente 130
3.12. Hemmstoffanalytische Untersuchungen 136
3.12.1. Hemmung durch SH-Reagenzien 136
3.12.2. Hemmung durch molekularen Sauerstoff 141
3.12.3. Einfluß von Schwermetallgiften auf die Enzymaktivität 142
3.13. Bestimmung des Isoelektrischen Punkts 146
3.14. Molekulargewichtsbestimmung 146
3.14.1. Kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation 147
3.14.2. Sephadex G-200-Gelfiltration 149
3.15. SDS-Gelelektrophorese: Versuche zur Bestimmung von Anzahl und Größe der Enzymuntereinheiten 149

DISKUSSION 152

ZUSAMMENFASSUNG 178

LITERATURVERZEICHNIS 181

Abkürzungen

ADH	Alkohol-Dehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Bis	N,N'-Methylen-bis-acrylamid
BV	Benzylviologen
CCCP	Carbonylcyanid-m-chlorophenylhydrazon
p-CMB	para-Chloromercuribenzoat
CTAB	Cetyl - trimethylammoniumbromid
DCPIP	Dichlorphenolindophenol
DEAE	Diäthylaminoäthyl
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid
FC	Ferricyanid
FMN	Flavinmononucleotid
FP	Frenchpresse
HAP	Hydroxylapatit
IEP	Isoelektrischer Punkt
MB	Methylenblau
MG	Molekulargewicht
MV	Methylviologen
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduziert)
NADP(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (reduziert)
PMS	Phenazinmethosulfat
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEA	Triäthanolamin (hydrochlorid)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
US	Ultraschall

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41534921_0003

EINLEITUNG

Die erste Isolierung eines Knallgasbakteriums (Hydrogenomonas pantotropha) im Jahre 1906 durch KASERER, und die an diesem Organismus durchgeführten Studien über die Oxidation des Wasserstoffs initiierten die gründlichere Erforschung des H_2-Stoffwechsels durch Mikroorganismen und die Suche nach einem biologischen Katalysator, der in der Lage ist, molekularen Wasserstoff zu aktivieren. 1931 gelang es STEPHENSON und STICKLAND erstmals, die Existenz des Enzyms "Hydrogenase" zu demonstrieren. In Gegenwart von Zellsuspensionen (Escherichia coli) konnte die Reduktion von Methylenblau und verschiedener anderer Substrate mit H_2 nachgewiesen werden.
Hydrogenasen katalysieren die Aktivierung des molekularen Wasserstoffs und seine reversible Übertragung auf physiologische Elektronenüberträger oder künstliche Redoxverbindungen:

$$H_2 + \text{Elektronenüberträger} \rightleftarrows \text{red. Elektronenüberträger} + 2H^+$$

Schon frühe Studien über die Austauschreaktion zwischen molekularem Wasserstoff und schwerem Wasser ($H_2 + HDO \rightleftarrows HD + H_2O$) an ganzen Zellen von Proteus vulgaris (HOBERMANN und RITTENBERG, 1943; FARKAS und FISCHER, 1947) im Vergleich mit der von der Hydrogenase ebenfalls katalysierten Umwandlung von para- in ortho-Wasserstoff (KRASNA und RITTENBERG, 1954) führten zu der bis heute nicht widerlegten These von KRASNA und RITTENBERG (1954), daß der Aktivierungsreaktion eine heterolytische Spaltung des H_2-Moleküls zugrundeliegt, die zur Bildung eines Protons und eines Enzymhydrid-Anions führt:

$$H_2 + E\ (\text{Hydrogenase}) \rightleftarrows H : E^- + H^+$$

Wurde in früheren Jahren angenommen, daß Hydrogenasen in nur einer engbegrenzten Zahl von Mikroorganismen vorkommen, so weiß man heute, daß sie nicht nur bei Algen und bei Bakterien ver-

schiedenster Stoffwechselgruppen weit verbreitet sind, sondern daß Hydrogenaseaktivität bereits auch in höheren Pflanzen (RENWICK et al., 1964) und sogar schon in Froscheiern (KURATA, 1962) gefunden wurde.

Von Funktion und stoffwechselphysiologischer Bedeutung her lassen sich zwei Hydrogenase-Grundtypen unterscheiden: das H_2-produzierende und das H_2-verwertende Enzym. Molekularen Wasserstoff produzierenden Hydrogenasen, die verbreitet sind bei streng anaeroben, gärenden und sulfatatmenden Bakterien, sowie bei photosynthetischen Organismen und fakultativ anaeroben Enterobacteriaceen (GRAY und GEST, 1965) kommt unter physiologischen Bedingungen die Aufgabe zu, die Zelle von überschüssigem Wasserstoff zu befreien und so als "Wasserstoff-Ablaßventil" zu dienen. Wasserstoffverwertende Hydrogenasen sind ebenfalls bei verschiedenen Stoffwechseltypen zu finden (phototrophe Bakterien und Grünalgen, Methanbakterien und Knallgasbakterien).

Eine zentrale Stellung nimmt hier die nach ihrer Fähigkeit zur Knallgasreaktion benannte, aber in sich selbst sehr heterogene Gruppe der Wasserstoffbakterien ein, denen eine fakultativ autotrophe und obligat aerobe oder fakultativ aerobe (Nitratatmer) Lebensweise gemeinsam ist. Der Hydrogenase kommt bei diesen Organismen die bedeutungsvolle Doppelfunktion zu, durch die Reduktion physiologischer Acceptoren einerseits Reduktionskraft für die CO_2-Fixierung bereitzustellen und andererseits durch das Einschleusen des aktivierten Wasserstoffs in den Elektronentransport für die Grundlage der Energiegewinnung zu sorgen (PACKER und VISHNIAC, 1955).

Erst vier Jahrzehnte nach der Entdeckung der Hydrogenase gelang es erstmals, weitgehend homogene Enzympräparate von Clostridium pasteurianum (NAKOS und MORTENSON, 1971a) und Desulfovibrio vulgaris (LEGALL et al., 1971) zu erhalten. Die Partikelgebundenheit vieler Hydrogenasen und die Schwierigkeit ihrer Solubilisierung, ebenso wie die Sauerstoffempfindlichkeit und Instabilität der untersuchten Enzyme, ließ die Hydrogenaseforschung bei den Knallgasbakterien in den letzten zehn Jahren stagnieren. Die bislang umfangreichsten Untersuchungen wurden 1963 an der

300fach angereicherten, löslichen Hydrogenase von Pseudonomonas ruhlandii durchgeführt (BONE, 1963; BONE et al., 1963). Untersuchungen zur Beschreibung und Darstellung des Hydrogenasesystems von Alcaligenes eutrophus beschränkten sich lange Zeit auf Fraktionen des Rohextraktes (WITTENBERGER und REPASKE, 1961; EBERHARDT, 1966; AHRENS und SCHLEGEL, 1966), auf mit Protaminsulfat und Calciumphosphat-Gel behandelte (REPASKE, 1962) oder an Sephadex G-100 fraktionierte Extrakte (REPASKE und DANS, 1968). Erst PFITZNER et al. (1970) berichteten von einer gelungenen Anreicherung und der teilweisen Charakterisierung der löslichen Hydrogenase von Stamm H16. Über das lösliche Enzym von Nocardia opaca 1b wurden erst kürzlich Untersuchungen ähnlichen Umfangs veröffentlicht (AGGAG und SCHLEGEL, 1974). All diesen Arbeiten fehlen aber Reinheitsanalysen der Hydrogenasen, ebenso wie ausreichende kinetische Studien und Untersuchungen, die u.a. Aussagen über Molekulargewicht, Untereinheitenstruktur, Eisen- und Flavingehalt der Enzyme enthalten, Untersuchungen also, die zwar weitgehend an reine Enzympräparate gebunden sind, die aber für eine exaktere Enzymcharakterisierung, wie sie bisher nur für die Hydrogenasen von C.pasteurianum und D.vulgaris vorliegen, unerläßlich sind. Die Reinigung und gründliche Charakterisierung der löslichen Hydrogenase von A.eutrophus H16 stand daher im Mittelpunkt dieser Arbeit, die ein Beitrag dazu sein soll, die Hydrogenaseforschung auch bei Knallgasbakterien wieder neu zu beleben und voranzutreiben.

Der Enzymanreicherung gingen vergleichende Untersuchungen an Hydrogenasen von Knallgasbakterienstämmen unterschiedlicher systematischer Stellung und Gattungszugehörigkeit (Paracoccus denitrificans, Corynebacterium autotrophicum, Pseudomonas facilis, Alcaligenes eutrophus) voraus. Sie befaßten sich schwerpunktmäßig mit der Stabilität, der Aktivitätsverteilung und Lokalisierung der Enzyme und ihrer Fähigkeit zur NAD(P)-Reduktion.

METHODEN

1. Organismen

Die Untersuchungen wurden an folgenden Bakterienstämmen durchgeführt: Alcaligenes eutrophus (Hydrogenomonas eutropha) H16 (ATCC 17699; WILDE, 1962) und die 1967 von SCHUSTER isolierten A.eutrophus-Stämme B19 (DSM 515) G27 (DSM 516) und N9A (DSM 518), ferner die Stämme Pseudomonas facilis (ATCC 17695; SCHATZ und BOVELL, 1952), Paracoccus denitrificans "Morris" (DSM 413; BANERJEE und SCHLEGEL, 1966), sowie die beiden Stämme von Corynebacterium autotrophicum, 14 g (DSM 431; RUDOLPH, 1968)und 7c (DSM 432; SIEBERT, 1969). Für einige Experimente wurden außerdem die schleimfreie Mutante von C.autotrophicum 7c (ANDREESEN und SCHLEGEL, 1974) und der Stamm RH2 von Pseudomonas pallero-nii (REH, unveröffentlicht) hinzugezogen.

2. Nährlösungen und Anzucht

2.1. Nährlösungen

Für die autotrophe Anzucht der Zellen wurde folgendes Mineralmedium nach SCHLEGEL et al. (1961) verwendet:

Lösung A	$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	0,90%
	KH_2PO_4	0,15%
	NH_4Cl	0,10%
	$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,02%
	$NaHCO_3$	0,05%
	Spurenelementlösung SL6	1 ml/l
Lösung B	$FeNH_4$-Citrat	0,005%
	$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,001%

Die Lösungen A und B wurden in bidestilliertem Wasser angesetzt und getrennt sterilisiert. Die oben angegebenen Prozentwerte beziehen sich auf die fertige Nährlösung.
Die Spurenelementlösung SL6 entspricht SL4 (nach PFENNIG und LIPPERT, 1966), ohne EDTA und Fe SO_4.
Für die Anzucht von Paracoccus denitrificans wurde dem Mineralmedium 0,05% Hefe-Extrakt-Lösung zugesetzt (Mixotrophes Wachstum).
Alle Kulturen wurden während des Wachstums mit einem Gasgemisch von 80% H_2, 10% O_2 und 10% CO_2 begast.

2.2. Anzucht der Zellen

Flüssigkeitsvorkulturen von 20 ml wurden in 100 ml-Erlenmeyerkolben angesetzt, in Witt'schen Töpfen begast und auf einer Schüttelmaschine bei 30°C geschüttelt.
Für 3 l-Kulturen wurden 6 l-Zweihalsrundkolben verwendet, die unter magnetischer Rührung bei 30°C über einen mit zwei Wattefiltern versehenen Aufsatz begast wurden (vgl. SCHLEGEL et al., 1961).
Größere Zellanzuchten erfolgten in 10 l-Fermentern (Biostat, F. Braun, Melsungen) bei 30°C, 600 Umdrehungen/min und einer Gaszufuhr von 500 ml/min, die mit Hilfe einer Dosierpumpe (Fa. Wösthoff, Bochum), reguliert wurde.

3. Trübungsmessung

Die optische Dichte der Zellsuspensionen wurde durch Trübungsmessung im Zeiss-Photometer PL 4 bei 436 nm und einer Schichtdicke von d = 1 cm gegen die Nährlösung bestimmt. Die Trübung von Zellsuspensionen der gelbpigmentierten Stämme von C.autotrophicum (7c und 14g) wurde bei einer Wellenlänge von 546 nm gemessen. Die Proben wurden in jedem Fall so verdünnt, daß sie die Extinktion von 0,3 nicht überschritten.

4. Ernte und Aufbewahrung der Zellen

Die Zellen wurden gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase geerntet und zweimal mit dem Phosphatpuffer (0,067 M, pH 7,0) nach SÖRENSEN (1909) gewaschen. Das Sediment wurde mit demselben Puffer aufgenommen und die Dichte der Suspension so eingestellt, daß der Proteingehalt etwa 20 mg/ml betrug. Weil der Natriumgehalt dieses Puffers auf die lösliche Hydrogenase von H16 sehr stark aktivitätsvermindernd wirkte, wurden die Zellen dieses Stammes, die im späteren Verlauf der Arbeit für Enzymanreicherungen und sich anschließende enzymatische Untersuchungen herangezogen wurden, in Kaliumdihydrogenphosphat-KOH-Puffer (0,05 M, pH 7,0) gewaschen und resuspendiert. Bis zum Zellaufschluß wurden die Zellen bei $-20^{\circ}C$ ausbewahrt.

5. Zellaufschlußmethoden

5.1. Ultraschallbehandlung der Zellen

Die Zellsuspensionen wurden in 10- bis 25 ml-Portionen mit einem Ultraschallgerät (Fa. Schoeller und Co., Frankfurt a.M) bei 20 kHz und 600 W aufgeschlossen. Die Beschalldauer betrug in der Regel 60 sec/ml. Für die Ausbeute an aktiver, löslicher Hydrogenase von H16 erwies sich bei einer Leistungskapazität des Ultraschallgerätes von 40% eine schon kurze Ultraschalleinwirkung von 10 sec/ml als optimal. Die Temperatur wurde während dieser Behandlung mit Hilfe eines Ultrakryomaten (TK 30 D, Meßgerätewerk Lauda) zwischen 0 und $10^{\circ}C$ gehalten.

5.2. Aufschluß durch die Frenchpresse

Die Zellsuspensionen wurden mit einem Druck von 80 kp/cm^2 durch die Öffnung einer vorgekühlten Frenchpresse (American Instru-

ments Inc., Silver Spring, Maryland) gedrückt und in einer eisgekühlten Vorlage aufgefangen.

5.3. Lysozymaufschluß unter verschiedenen Bedingungen

Je 4 ml aufgetauter Zellen wurden abzentrifugiert und in 3,5 ml Tris-HCl-Puffer (50 mM, pH 8,0) wieder aufgenommen. Die Suspension wurde dann mit 0,5 ml und einer Lysozymlösung versetzt, die je nach Organismen unterschiedlich konzentriert war. In der Regel betrug die Lysozymendkonzentration 20 µg/mg Feuchtgewicht. Nach 30minütiger Inkubation in einem Wasserbad bei 37°C wurden zur Herabsetzung der Viskosität 20 µg/ml DNase zugegeben. Die Inkubation wurde daraufhin weitere 15 min fortgesetzt, ehe die Suspension homogenisiert und 1o min bei 3000 g zentrifugiert wurde.
Diese Versuchsmethode wurde auch in Gegenwart von EDTA (100 µg/mg Feuchtgewicht) und Polymyxin B (nach KLEMME, 1972) durchgeführt. Der Zusatz von EDTA machte ebenso die Beifügung von $MgCl_2$ (1-5 mM) erforderlich, um die durch EDTA gehemmte DNase zu reaktivieren.
Eine weitere Modifizierung des Lysozymaufschlusses bestand darin, daß die Zellen mit EDTA vorbehandelt wurden (nach FINDLEY und AKAGI, 1968), ehe sie der oben beschriebenen Prozedur unterworfen wurden.

6. Herstellung partikulärer und löslicher Fraktionen des Rohextraktes

Nach dem Aufschluß der Zellen wurden die Zelltrümmer je nach Aufschlußmethode 20 min bei 10 000 g (Aufschluß durch Ultraschall und Frenchpresse) oder 10 min bei 3000 g (Lysozymaufschluß) abzentrifugiert. Das Überstehende, als Rohextrakt bezeichnet, wurde durch einstündige Zentrifugation bei 100 000 g und durch dreistündige Zentrifugation bei 140 000 g in einer

Omikron-Zentrifuge (Fa. Christ, Osterode) jeweils aufgetrennt in einen Überstand (Lösliche Fraktion) und in ein rötliches, gelatinöses Sediment (Partikelfraktion), das in 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) homogen suspendiert wurde. Die einzelnen Fraktionen wurden folgendermaßen differenziert und gekennzeichnet:

100 000 g-Überstand ——→ lösliche Fraktion L 1
140 000 g-Überstand ——→ lösliche Fraktion L 2
100 000 g-Sediment ——→ Partikelfraktion P 1
140 000 g-Sediment ——→ Partikelfraktion P 2

7. Fraktionierung von Rohextrakten im diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten

Diese Methode diente zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung und Lokalisierung der Hydrogenasen von Pseudomonas facilis und Corynebacterium autotrophicum 7c.
In einem Zentrifugenröhrchen aus Cellulose-Nitrat (1,4 cm im Durchmesser, 9,5 cm lang) wurden einzelne, zwischen 10 und 70% konzentrierte und in 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) getrennt angesetzte Saccharose-Lösungen stufenweise übereinandergeschichtet. Welche Konzentrationsstufen Verwendung fanden, wievielstufig der Gradient war und welche Volumina im Einzelnen eingesetzt wurden, variierte je nach Versuchsansatz und ist aus den Legenden der entsprechenden Abbildungen und aus den Abbildungen selbst zu ersehen. Auf die oberste Saccharose-Schicht wurde vorsichtig 1 ml Rohextrakt aufgetragen. Das Gesamtvolumen betrug 12 ml. Der diskontinuierliche Stufengradient wurde in einer Beckmann Spinco-Ultrazentrifuge (Modell L 2 - 65 B; Schwenkrotor SW 40) 16 Std bei 26 000 Umdrehungen/min zentrifugiert. Nach Durchstechen des Röhrchenbodens mittels einer Hohlnadel wurden Fraktionen zu je 15 Tropfen entnommen, deren Enzymaktivitäten (Hydrogenase, NADH-Oxidase, Malat-Dehydrogenase und

Katalase) anschließend bestimmt wurden. Die Katalase war dem Rohextrakt vor der Auftragung als zusätzliches Referenzprotein beigefügt worden (0,5 mg/ml).

8. Proteinbestimmungen

8.1. Biuretmethode nach BEISENHERZ et al., 1953

0,1 ml des Extraktes wurde mit 0,75 ml H_2O dest. versetzt. Durch Zugabe von 0,15 ml 2M Trichloressigsäure wurde das Protein ausgefällt und 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das Sediment in 4,9 ml H_2O und 5 ml Biuretreagenz aufgelöst und die Mischung 30 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde in 2 cm-Küvetten bei 546 nm gegen einen Leerwert gemessen. Eine Proteineichkurve wurde mit Rinderserumalbumin aufgenommen.

Zusammensetzung des Biuretreagenz:

NaK-Tartrat	9 g
$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	3 g
KJ	5 g
NaOH 0,2 N ad	1000 ml

8.2. Proteinbestimmung nach LOWRY et al., 1951

Reagenz A: 50 ml 3% Na_2CO_3 in 0,1 N NaOH
1 ml 1% $CuSO_2 \cdot 5\ H_2O$
1 ml 2% K-Na-Tartrat

Die einzelnen Bestandteile wurden kurz vor Gebrauch vereinigt.

Reagenz B: Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz (1:1 mit H_2O bidest. verdünnt)

Das Probevolumen wurde mit Wasser auf 1 ml aufgefüllt und mit 5 ml Reagenz A gemischt. Nach 10 min Einwirkungsdauer bei Raum-

temperatur wurden 0,5 ml Reagenz B hinzugefügt und die Proben 20 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend wurde die Extinktion bei 546 nm in 2 cm-Küvetten gegen den Nullwert gemessen. Eine Eichkurve wurde auch hier mit Rinderserumalbumin aufgenommen.

8.3. Proteinbestimmung nach WARBURG und CHRISTIAN, 1942 (Schnelltest)

Mit einem Zeiss-Spektralphotometer PM 4 wurde die Extinktion der Proben bei 260 und 280 nm gemessen. Aus dem Verhältnis beider Meßwerte konnte mit Hilfe einer Tabelle der Proteingehalt ermittelt werden.

9. Photometrische Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität wurde für jedes Enzym in Einheiten (E) pro g Protein angegeben. Eine Einheit hat ein Enzym, das unter den vorgegebenen Testbedingungen 1 µmol Substrat/min umsetzt.Die Messungen wurden, wenn nicht anders angegeben, im Zeiss-Spektralphotometer PL 4 bei einer Wellenlänge von 365 nm in 1 cm-Küvetten durchgeführt. Die Extinktionsänderung wurde über einen TE-Wandler mit einem Zeiss-Kompensationsschreiber (Servogor RE 511) registriert. Die Meßtemperatur wurde durch einen temperierbaren Küvettenblock auf 30°C konstant gehalten.

9.1. Hydrogenase (NAD-Reduktion)

2,89 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0 (H_2-gesättigt)
0,01 ml Enzymlösung
0,1 ml 24 mM NAD (Endkonz.: 0,8 mM)

Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe von NAD. Die Küvette wurde mit einem Teflonstopfen verschlossen.
Die lösliche Hydrogenase von H16 erwies sich unter hohem Wasserstoffpartialdruck als unempfindlich gegenüber geringen Sauerstoffmengen. Auf Einhaltung streng anaerober Bedingungen konnte daher verzichtet werden. Ebenso waren die in der Testzeit auftretenden Wasserstoffverluste zu vernachlässigen (H_2-Verlust nach 2 min ca. 1,5%), zumal in der Regel mit sättigenden Konzentrationen gearbeitet wurde, deren geringfügige Veränderungen auf die Enzymaktivität keinerlei Einfluß hatten. Für einige kinetische Untersuchungen und zur Überprüfung des O_2-Einflusses auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurden dennoch folgende Bedingungen eingehalten: Der Puffer wurde in einer Wulf'schen Flasche bei 30°C vorinkubiert und unter Rührung kontinuierlich mit O_2-freiem Wasserstoff begast. Die Küvetten und die die Enzym- und NAD-Lösung enthaltenden Röhrchen wurden mit Gummikappen verschlossen und mittels zweier Kanülen (für Gaseinlaß und -auslaß) ebenfalls mit H_2-Gas durchströmt. Nach ausreichender Wasserstoffsättigung wurden die Lösungen in die Küvetten eingespritzt. Zusätze von Reduktionsmitteln (Mercaptoäthanol, Glutathion) erwiesen sich als ineffektiv. Sie führten zu keinerlei Aktivitätssteigerung.

Für die photometrische Bestimmung der Reduktion von Cytochrom c, Methylenblau (MB), Dichlorphenolindophenol (DCPIP) und Ferricyanid ergaben sich folgende abgewandelte Bedingungen:

Substrat	Endkonz. (mM)	Wellenlänge (nm)
Cytochrom c	0,2	550
MB	0,04	660
DCPIP	0,04	660
Ferricyanid	0,6	405

Die Messungen bei 550 und 660 nm erfolgten im Zeiss-Photometer PM 4.

9.2. Diaphorase (Ferricyanid-Reduktion)

2,79 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0
0,1 ml 18 mM NADH
0,1 ml 18 mM Ferricyanid
0,01 ml Enzymlösung

Für die Bestimmung der Cytochrom c-, MB- und DCPIP-Reduktion gelten die oben schon für die Hydrogenase beschriebenen abgewandelten Bedingungen. Die Messungen wurden anaerob unter N_2 durchgeführt.

9.3. NADH-Oxidase

1 ml 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,2
0,2 ml 4,5 mM NADH
1,7 ml H_2O bidest.
0,1 ml Extrakt

9.4. Malat-Dehydrogenase

1 ml 100 mM Tris-HCl-Puffer, pH 9,2
0,2 ml 4,5 mM NADH
0,2 ml 23 mM K-Oxalacetat
1,5 ml H_2O bidest.
0,1 ml Extrakt

9.5. Fructose-1,6-diphosphat-Aldolase (nach RACKER, 1947)

2,86 ml TEA-Puffer, pH 7,6; 0,05 M
0,05 ml NADH (10 mg/ml)
0,05 ml FDP (Na-Salz, 30 mg/ml)
0,02 ml GDH : TIM (2 mg/ml)
0,01 ml Enzymlösung

9.6. Alkohol-Dehydrogenase (Boehringer Informationen)

2,57 ml O,1 M Natriumpyrophosphatpuffer, pH 9,O
O,1 ml 2,2 M Semicarbazidhydrochlorid
O,2 ml O,O3 M NAD
O,O1 ml O,3 M Glutathion
O,1 ml abs. Äthanol
O,O2 ml Enzymlösung

9.7. Katalase (nach BERGMEYER, 1955)

2,98 ml Peroxidlösung, pH 7,O (O,O5 ml Perhydrol-Merck mit O,O5 M K-Phosphatpuffer auf 5O ml aufgefüllt)
O,O2 ml Enzymlösung

Die Extinktionsabnahme wurde bei 24O nm im Zeiss-Photometer PM 4 gemessen.

10. Wasserstoffbestimmung

Der Reaktionsansatz entspricht dem des unter 8.1. aufgeführten NAD-Reduktionstests. Zur Erreichung verschiedener Wasserstoffkonzentrationen wurde der Puffer mit H_2 und N_2 als Füllgas in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen gesättigt. Eine Grobeinstellung der Mischungsverhältnisse der Gase war mittels eines geeichten Gasdurchflußmessers möglich. Die genaue, im Test wirksame Wasserstoffkonzentration ließ sich als Endwert im optischen Test mit Hilfe der gebildeten Menge NADH, die der verbrauchten Menge H_2 äquivalent ist, bestimmen. Bei 365 nm entspricht 1 mM NADH einer Extinktion von 3,5.

11. Manometrische Bestimmung von H_2-Aufnahme- und H_2-Produktionsraten

Manometrische Messungen wurden in einer Rundwarburgapparatur

(Fa. Braun, Melsungen) bei einer Schüttelfrequenz von 140/min und einer Amplitude von 4 cm durchgeführt. Die Warburggefäße, deren Flüssigkeitsvolumen stets 2,2 ml betrug, wurden bei einer Inkubationstemperatur von 30°C 20 min unter Schüttelung mit Gas (H_2 oder N_2) durchströmt, das zuvor über eine Waschflasche mit 20%iger pyrogallolgesättigter KOH geleitet wurde. Der an den Manometern registrierbare Druck während des Begasens belief sich auf 10 cm. Nach der Begasungsprozedur wurden die Gefäße bis zum Druckausgleich weitere 10-15 min geschüttelt, ehe die Reaktion durch Kippen des Seitenarminhalts in den Hauptarm gestartet wurde.
Die spezifische H_2-Aufnahme- bzw. H_2-Produktionsrate wurde in µl H_2/Std · mg Protein angegeben.

11.1. H_2-Aufnahme durch zellfreie Extrakte

Die Hydrogenaseaktivität in zellfreien Extrakten (Rohextrakte, lösliche und partikelgebundene Fraktionen des Rohextraktes) wurde manometrisch als H_2-Aufnahme in einarmigen Warburggefäßen bestimmt. Als Wasserstoffacceptor diente Methylenblau.

Reaktionsansatz:

Hauptraum:	1,78 ml	0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,0
	0,02 ml	Extrakt
Seitenarm:	0,4 ml	0,025 M Methylenblau (10 µmole)
Atmosphäre:	100% H_2	

11.2. H_2-Aufnahme durch gereinigtes Enzym

Die gereinigte, lösliche Hydrogenase von H16 konnte andere H-Acceptoren als NAD nur dann reduzieren, wenn sie selbst in der reduzierten, aktiven Form vorlag. Die H_2-Aufnahme mit verschiedenen physiologischen Elektronenüberträgern und künstlichen Redoxverbindungen wurde daher in Gegenwart katalytischer

Mengen NADH durchgeführt, die ausreichen, das Enzym nach Vorinkubation mit Wasserstoff in erforderlichem Maße zu aktivieren. Zwei weitere Bedingungen waren zu beachten, die das Arbeiten mit zweiarmigen Warburggefäßen notwendig machten:

1. Das NADH war nur wirksam, wenn es dem Enzym vor der Substratlösung zugegeben wurde.
2. Die mit der Aktivierung einhergehende Instabilität des Enzyms erforderte es, daß die NADH-Lösung nicht schon von Anbeginn in den Hauptraum des Warburggefäßes pipettiert, sondern erst kurz vor Reaktionsstart durch Kippen zugesetzt werden durfte.

Reaktionsansatz:

Hauptraum:	1,39 ml	50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0
	0,01 ml	Enzymlösung
1. Seitenarm:	0,4 ml	27,5 µM NADH
2. Seitenarm:	0,4 ml	12,5 mM H-Acceptor (5 µmole)

Die Warburggefäße wurden 20 min mit H_2 durchspült und anschließend weitere 10 min geschüttelt, ehe die NADH-Lösung aus dem ersten Seitenarm in den Hauptraum gekippt wurde. Nach zweiminütiger Inkubation wurde die H-Acceptorlösung aus dem zweiten Seitenarm gekippt und die Reaktion gestartet.

11.3. H_2-Entwicklung

Für die Messungen der Wasserstoffentwicklung wurden ebenfalls zweiarmige Warburggefäße verwendet. Im ersten Seitenarm befand sich festes Dithionit, das die Aufgabe hatte, das im zweiten Seitenarm befindliche Substrat (Methylviologen, Benzylviologen) zu reduzieren, oder, wenn NADH als H-Donator vorlag, für erhöhte reduzierende Bedingungen zu sorgen. Beide Seitenarminhalte wurden vor Meßbeginn unmittelbar hintereinander in den Hauptraum gekippt.

Reaktionsansatz:

Hauptraum:	1,39 (1,30) ml	50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0
	0,01 (0,1) ml	Enzymlösung
1. Seitenarm:	2 mg	Dithionit
2. Seitenarm:	0,4 ml	12,5 mM Substrat (5 µmole)
Atmosphäre:	100% N_2	

Um das produzierte Gas sofort als molekularen Wasserstoff identifizieren zu können, wurde in einem Parallelansatz 0,1 g von 10% Palladiumasbest in den Zentralzylinder gefüllt. Palladium zeichnet sich durch das spezifische Vermögen aus, H_2 zu absorbieren.

12. Gaschromatographischer Nachweis der Wasserstoffentwicklung

Um den sich in den Warburggefäßen entwickelten molekularen Wasserstoff auch gaschromatographisch nachweisen zu können, wurden die Gefäße nicht an Manometern befestigt, sondern mit einem Gummistopfen verschlossen und über zwei Spitzkanülen mit Stickstoff begast. Nach Start der Reaktion durch Kippen der Seitenarminhalte (vgl. unter 10.3 angegebenen Reaktionsansatz) wurden die Methylviologen enthaltenden Gefäße bis zur Entfärbung (15 min), die NADH enthaltenden Gefäße 90 min geschüttelt. Die Analysen zum qualitativen Nachweis des Wasserstoffs wurden in einem Gaschromatographen mit Wärmeleitfähigkeitsdetektor und Säulenschaltung (Typ 990, Fa. Bodenseewerk Perkin-Elmer und Co.) durchgeführt. Die Gasproben wurden den Warburggefäßen durch gasdichte Spritzen (Typ 1001, Fa. Hamilton Bonaduz AG, Schweiz) entnommen. Zur Trennung der Gasgemische diente eine 4 m gepackte Säule mit 10,12 g Kieselgel Jole (Typ 050.93, Perkin-Elmer), mesh 30-60 und eine 3 m gepackte Säule mit 6,28 g Molekularsieb 5 Å (Typ 050.91, Perkin-Elmer) 30-60 mesh. Die verwendeten 1/8 Zoll Stahlsäulen hatten einen Innendurchmesser von 2 mm. Das Säulenfüll-

material wurde unter Durchströmen des Trägergases Argon (40 ml/min) bei 300°C aktiviert. Für die Analysen wurden folgende Betriebsbedingungen gewählt:

Injektor: 100°C; Manifold: 100°C;
Ofen: 60°C, isotherm; Detektor: 150°C und 125 m A;

13. Anreicherung der löslichen Hydrogenase aus A. eutrophus H16

Das Ausgangsmaterial für die Enzymanreicherung bildeten 150 ml zellfreier Extrakt (100 000 g-Überstand des Rohextraktes) autotroph gewachsener Zellen von H16. Alle Anreicherungsschritte wurden bei 0-4°C durchgeführt.

13.1. Fällung mit N-Cetyl-N,N,N-trimethyl-ammoniumbromid (CTAB)

Dem Extrakt wurde mittels einer Bürette eine 2,5%ige CTAB-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,15% kontinuierlich und unter langsamer magnetischer Rührung zugetropft. Nach weiterer 15minütiger Rührung wurde der Niederschlag 20 min bei 20 000 Upm abzentrifugiert.

13.2. Ammoniumsulfat-Fraktionierung

Festes, pulverisiertes Ammoniumsulfat wurde im ersten Fraktionierungsschritt ebenfalls unter steter Rührung bis zu 40%iger Sättigung zugesetzt. Nach dem Abzentrifugieren des Niederschlages (10 min bei 15 000 Upm) wurde in einem zweiten Fraktionierungsschritt die Ammoniumsulfat-Sättigungskonzentration im löslichen Überstand bis auf 60% erhöht. Der Überstand nachfolgender Zentrifugation (10 min bei 15 000 Upm) wurde verworfen und das Präzipitat der Fällung wurde in 16 ml 20 mM Kaliumphosphat

(KP-)-Puffer, pH 7,0, aufgenommen und 6 Std gegen 5 l desselben Puffers dialysiert.

13.3. DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 7,0

Die dialysierte Proteinlösung (22 ml) wurde über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche einer DEAE-Cellulose-Säule (2,5 x 45 cm; Füllhöhe 40 cm) aufgetragen, die zuvor mit 20 mM KP-Puffer, pH 7,0, äquilibriert worden war. Das Protein wurde mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert. Das vordere Niveaugefäß enthielt 300 ml 20 mM KP-Puffer, pH 7,0, und das hintere Gefäß 300 ml des gleichen Puffers mit 0,5 M KCl. Mit Hilfe eines Fraktionssammlers (LKB 7000 Ultrorac, Bromma, Schweden) wurden 200 Fraktionen aufgefangen. Das Elutionsvolumen der einzelnen Fraktionen betrug 3 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 18-20 ml/Std. Die Fraktionen 122 bis 145, die den größten Enzymaktivitätsanteil enthielten, wurden vereinigt und 6 Std. gegen insgesamt 10 l 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,2, dialysiert. Der Dialysepuffer (jeweils 2 l) wurde stündlich erneuert.

13.4. DEAE-Cellulose-Chromatographie bei pH 8,2

Bis auf den veränderten Puffer, es wurde 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,2, eingesetzt, blieben die Versuchsbedingungen gegenüber dem ersten DEAE-Cellulose-Schritt unverändert. Nach Vereinigung der Fraktionen 93-104 wurde die Proteinlösung erneut dialysiert (6 Std gegen 10 l 50 mM KP-Puffer, pH 7,0) und anschließend in einer Diaflo-Ultrafiltrationszelle (Fa. Amicon N.V., Den Haag, Holland) unter Verwendung eines PM 10-Membranfilters auf 1,5 ml eingeengt.

13.5. Sephadex G-200-Gelfiltration

Zur effektiveren Auftrennung der Proteine wurden zwei Chromatographierohre (je 2,5 x 45 cm; Füllvolumen 350 ml) hintereinandergeschaltet. Die Säulen waren am unteren Ende durch einen kurzen Kapillarschlauch verbunden. Das Extraktkonzentrat wurde durch Zusatz einiger Saccharosekristalle beschwert und zwischen Geloberfläche und Puffer-Überstand geschichtet. Das Sephadex G-200-Gel war zuvor mit 50 mM KP-Puffer, pH 7,0, äquilibriert worden. Unter konstantem Arbeitsdruck (15 cm) und bei einer Durchflußrate von 12 ml/Std wurden mit dem gleichen Puffer 150 2 ml-Fraktionen eluiert. Um eine langandauernde Dialyse zu vermeiden, wurde der Extrakt-Pool (Fraktionen 90-98) durch eine 1:5-Verdünnung mit Wasser (bidest.) auf eine KP-Konzentration von 10 mM (pH 7,0) gebracht und auf 2 ml in einer Diafloultrafiltrationszelle eingeengt.

13.6. Chromatographie an Hydroxylapatit

Eine 1,6 x 30 cm-Säule wurde mit Hydroxylapatit (Biogel HT) gepackt (Füllvolumen 30 ml) und mit 10 mM KP-Puffer pH 7,0, äquilibriert. Nach der Probenauftragung mit Hilfe eines Flow-Adapters, wurde ein linearer Kaliumphosphatgradient angelegt. Die Niveaugefäße enthielten je 125 ml 10 mM KP-Puffer (vorderes Gefäß) bzw. 300 mM KP-Puffer (hinteres Gefäß). Bei einer Durchflußrate von 12 ml/Std wurden 125 Fraktionen von je 2 ml gesammelt. Es wurden getrennt voneinander drei Pools gebildet: Pool I (Fraktionen 29-32), Pool II (33-36) und Pool III (37-41). Die Pools wurden in einem Zeitraum von 6 Std gegen je 5 l 50 mM KP-Puffer, pH 7,0, dialysiert, in einer Diafloultrafiltrationszelle getrennt voneinander bis auf eine Proteinkonzentration von 1-1,5 mg/ml eingeengt und sodann elektrophoretisch untersucht.

14. Gelelektrophoretische Analysen

14.1. Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese

Es wurden folgende Gelsysteme verwendet:

Gelsystem A (7,5%, pH 9,5), nach MAURER (1968)

a)	1 M HCl	48 ml	b)	Acrylamid	30 g
	Tris	36,3 g		Bis	0,8 g
	TEMED	0,46 ml		$K_3Fe(CN)_6$	15 g
	H_2O bidest. ad	100 ml		H_2O bidest. ad	100 ml
c)	Ammoniumpersulfat	0,14 g	d)	1 M H_3PO_4	25,6 ml
	H_2O bidest. ad	100 ml		Tris	5,7 g
				H_2O bidest. ad	100 ml
e)	Acrylamid	10 g	f)	Riboflavin	4 mg
	Bis	2,5 g		H_2O bidest. ad	100 ml
	H_2O bidest. ad	100 ml			

Die Lösungen wurden wie folgt kurz vor Bereitung des Gels vereinigt:

Untergel:	1 Teil	a)
	2 Teile	b)
	1 Teil	H_2O bidest.
	4 Teile	c)
Obergel:	1 Teil	d)
	2 Teile	e)
	1 Teil	f)
	4 Teile	H_2O bidest.

Elektrophoresepuffer:	Tris	0,6 g
	Glycin	2,88 g
	H_2O bidest. ad	1000 ml

Gelsystem B (7,5%, pH 7,7), modifiziert nach HEDRICK und SMITH (1968)

a)	1 N HCl	48 ml	b)	Acrylamid	30 g
	Imidazol	11,7 g		Bis	0,8 g
	TEMED	0,24 ml		H_2O bidest. ad	100 ml
	1 M KH_2PO_4 (pH 8,0)	10 ml			
	H_2O bidest. ad	100 ml			
c)	Ammoniumpersulfat	0,14 g	d)	1 N HCl	48 ml
	H_2O bidest. ad	100 ml		Imidazol	2,93 g
				TEMED	0,46 ml
				H_2O bidest. ad	100 ml
e)	Acrylamid	10 g	f)	Riboflavin	4 mg
	Bis	2,5 g		H_2O bidest. ad	100 ml
	H_2O bidest. ad	100 ml			

Elektrophoresepuffer: Imidazol 46,5 mg
DL-Asparagin 1,44 g
H_2O bidest. ad 1000 ml

Die Zusammensetzung der mengenmäßigen Anteile der Lösungen von a) bis f) zur Herstellung von Unter- und Obergel ist identisch mit der des Gelsystems A. Zur Präparation höherprozentiger Gele wurden die mengenmäßigen Anteile der Acrylamidlösungen und von Wasser entsprechend variiert.
2,7 ml Untergel (Trenngel) und 0,2 ml Obergel (Sammelgel) wurden in Glasröhrchen (0,6 cm Innendurchmesser, 14 cm Länge) gefüllt und polymerisiert. Enzymproben (Proteingehalt: 25-75 µg) wurden, nachdem zuvor Bromphenolblau (5 µl einer 0,05%igen Lösung als Markierungsfarbstoff ("Frontmarker") zugesetzt und die Lösung durch einige Kristalle Saccharose beschwert worden war, durch Unterschichten auf das Sammelgel aufgetragen. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde die WTW-Trennkammer EEP 100 (Wiss.-Techn. Werkstätten/Weilheim) verwendet. Die Zirkulation

des Elektrophoresepuffers zwischen Unter- und Oberteil der Kammer besorgte eine Umwälzpumpe (Typ 101,40, Fa. Heidolph/Kehlheim) unter ständiger Wasserkühlung. Pro Gelröhrchen wurde eine Stromstärke von 2,5-3 mA angelegt, die über ein Netzgerät (GT 500, Wiss.-Techn. Werkstätten/Weilheim) regulierbar war. Die Laufzeit für eine elektrophoretische Trennung betrug je nach verwendeter Gelkonzentration (7,5-12,5%) 4 bis 8 Std. Nach der Elektrophorese wurden die Gele 2-3 Std in einer Lösung von 1,25 g Coomassie-Brilliant-Blue R 250 in 454 ml 50% Methanol und 46 ml Essigsäure angefärbt (nach WEBER und OSBORN, 1969). Die Entfärbung der Gele erfolgte nach der Methode von KÖNIG et al. (1970). Das Färbebad, das im Zeitraum von ca. 30 Std zwei- bis dreimal gewechselt wurde, setzte sich aus Eisessig, Methanol und Wasser im Verhältnis 1:6:14 zusammen.

14.2. Nachweis der Hydrogenase im Polyacrylamid-Gel

Die Hydrogenasebanden wurden durch eine gekoppelte Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium (Aktivitätsfärbung) nachgewiesen. Dazu wurde das zu untersuchende Gel in ein mit Aluminiumfolie umwickeltes Reagenzröhrchen gelegt, das 15 ml H_2-gesättigten, 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) enthielt. Nach Versetzung des Puffers mit NAD (1 mM), Nitroblau-Tetrazolium (0,06 mM) und Phenazinmethosulfat (0,1 mM), wurde das Röhrchen im Dunkeln bei 30°C inkubiert. Schon nach wenigen Minuten begann sich die Enzymbande blauviolett zu färben.

Die Aktivitätsfärbung mit Methylviologen (MV), modifiziert nach dem Verfahren von ACKRELL et al. (1966), wurde ebenfalls durchgeführt. Wegen der leichten Autoxidabilität des MV mußte strenger anaerob gearbeitet werden. Zur Erhöhung reduzierender Bedingungen wurden dem H_2-gesättigten Puffer (15 ml Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0) der neben 0,1% MV auch katalytische Mengen NADH (0,01 mM) enthielt, geringe Mengen Dithionit zugesetzt, bis die farblose Lösung leichte Blaustichigkeit zeigte. An der Stelle

im Gel, an der sich die Hydrogenase befand, bildete sich während der Inkubation bei 30°C ein intensiv blauer Ring von reduziertem MV aus.

14.3. SDS-Elektrophorese, modifiziert nach WEBER und OSBORN (1969)

Bereitung des Gels

Elektrophoresepuffer (pH 7,1):	0,5 M $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	34,8 ml
	0,5 M $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	15,2 ml
	H_2O bidest. ad	1000 ml

Diesem Puffer wurde unter leichtem Rühren 1 g SDS zugesetzt.

Acrylamidlösung (1/%ig):	Acrylamid	15 g
	Bis	0,4 g
	± Harnstoff	72,12 g
	Elektrophoresepuffer ad	150 ml

Zur Herstellung des Gels wurden gemischt:

Acrylamidlösung	140 ml
Natriumsulfit (wasserfrei)	50 mg
TEMED	0,1 ml
Ammoniumpersulfat (2%ige Lösung)	2,8 ml

Vorbereitung der Proteinproben

Die Proteine wurden in 0,01 M Natriumphosphatpuffer, pH 7,1, gelöst (Referenzproteine Katalase, Ovalbumin, Chymotrypsinogen A und Cytochrom c) oder gegen denselben Puffer dialysiert (Hydrogenase). Je 45 µl Proteinlösung (250 µg Protein) wurden mit 5 µl Puffer versetzt, der 10% SDS und 10% Mercaptoäthanol oder Dithioerythritol enthielt. Die Proben wurden sodann 2 oder

4 Stunden in Abwesenheit oder Gegenwart von 8 M Harnstoff bei 37°C inkubiert. Vor der Elektrophorese wurden den Probelösungen noch jeweils 5 µl Bromphenolblaulösung (0,05%ig) und einige Saccharosekristalle zugefügt.

Durchführung der Elektrophorese

Die SDS-Elektrophorese wurde als vertikale Platten-Elektrophorese in einer von STEGEMANN (1972) konstruierten Apparatur durchgeführt. Die Gellösung wurde in einen durch eingelegte Abstandshalter geschaffenen Hohlraum zwischen Kühlfläche und Seitenfläche der beiden Kammern der Apparatur eingefüllt. Das Gel war 3 mm dick, 17,8 cm lang und 12,7 cm breit. Ein Trogformer ("Kamm"), der für die Ausbildung 8 voneinander getrennter Geltaschen sorgte, wurde mit einpolymerisiert und unmittelbar vor der Proteinauftragung vorsichtig wieder entfernt. Die Proteinproben wurden mit Hilfe einer durch eine Kapillare verlängerten Injektionsspritze in die einzelnen Geltaschen eingefüllt. Eine Pumpe (vgl. 14.1.) wälzte den Puffer unter Wasserkühlung um. Die Stromstärke betrug 80 mA, die Spannung 200 V. Dauer der Elektrophorese: 3,5-4,5 Std. Färbung und Entfärbung des Gels erfolgte wie unter 14.1. beschrieben. Lediglich die Einwirkungsdauer der Färbelösung wurde auf 8-10 Std ausgedehnt.

15. Bestimmung des Isoelektrischen Punktes

Lösungen

Kathodenlösung (schwer):			Anodenlösung (leicht):		
NaOH	0,2	g	konz. H_2SO_4	0,1	ml
Saccharose	12	g	H_2O bidest.	10	ml
H_2O bidest.	14	ml			

Dichtegradientenlösung (schwer):		Dichtegradientenlösung (leicht):	
Ampholin-Lösung	2,25 ml	Ampholin-Lösung	0,75 ml
Saccharose	28 g	H_2O bidest.	59,25 ml
H_2O bidest.	39,75 ml		

Füllen der Säule und Durchführung der Isoelektrischen Fokussierung

Die Isoelektrische Fokussierung wurde durchgeführt in einer 110 ml fassenden Fokussiersäule (LKB, Typ 8101, Schweden). Schon während des Füllens wurde die Säule, die mit einem Kühlmantel umgeben ist, mit Hilfe eines Ultrakryomaten (vgl. 4.1) gekühlt. Die Temperatur der Kühlflüssigkeit betrug 6°C. Mittels einer peristaltischen Pumpe (LKB, Bromma, Schweden), wurde zuerst die Kathodenlösung in den Zentralzylinder der Säule gefüllt. Die Pumpe wurde dann an zwei miteinander verbundene Niveaugefäße angeschlossen, mit deren Hilfe der Saccharosedichtegradient geformt wurde, der die Säulenfüllung gegen Konvektion und Vermischung stabilisieren sollte. Die Dichtegradientenlösung enthielt neben Saccharose auch die als Carrier-Ampholyte dienenden Ampholine (Original LKB; pH-Bereich: 3-10). Im vorderen Niveaugefäß befanden sich 55 ml der schweren Gradientenlösung, im hinteren Gefäß die gleiche Menge der leichten Lösung. Nachdem ca. 1/3 der Gradientenlösung in den Fokussierzylinder gepumpt war, wurde 1 ml der Enzymlösung mit 1 ml der schweren Lösung versetzt und ebenfalls mittels Pumpe aufgetragen. Anschließend wurde der Zylinder mit der Gradientenlösung aufgefüllt und die Anodenlösung direkt auf den Gradienten bis ca. 1 cm über die positiv geladene Elektrode gepumpt. Die Enzymprobe verteilte sich gemäß ihrer Dichte im zweiten Drittel der Säule. An die Fokussiersäule wurde eine Spannung von 310 V angelegt. Die Anfangsstromstärke von 5 mA sank im Laufe des Versuchs auf 0,4 mA ab. Nach 48 Std wurde der Säuleninhalt eluiert und die Enzymaktivität und der pH-Wert der gesammelten Fraktionen (65 à 1,8 ml) bestimmt.

16. Molekulargewichtsbestimmung

16.1. Gelfiltration auf Sephadex G-200

Die Molekulargewichtsbestimmung erfolgte nach ANDREWS (1964). Eine Säule (2,5 x 45 cm, Füllhöhe: 38 cm), die mit Sephadex G-200 fine homogen gepackt war, wurde mit 50 mM KP-Puffer, pH 7,0, äquilibriert. Als Referenzen mit bekanntem Molekulargewicht (MG) wurden neben der Alkohol-Dehydrogenase (ADH) Eichproteine aus der Boehringer Combithek (Ferritin, Aldolase, Chymotrypsinogen A) eingesetzt. Die Referenzproteine wurden in 1,2 ml Hydrogenaselösung aufgenommen (Gesamtproteingehalt ca. 12 mg) und auf die Säule durch Unterschichten aufgetragen (vgl. 12.5.). Die Elution erfolgte unter konstantem Arbeitsdruck und mit demselben Puffer, mit dem die Säule äquilibriert worden war. Es wurden 200 Fraktionen zu je 1,2 ml gesammelt. Die Durchflußrate lag bei 12 ml/Std. Die Verteilung der Proteine in den Fraktionen wurde entweder durch Messung der Enzymaktivität (Hydrogenase, Aldolase und Alkohol-Dehydrogenase) oder durch Messung der Absorption (Ferritin: E_{400}, Chymotrypsinogen A: E_{280}) bestimmt. Das Elutionsvolumen der Proteine konnte nach dem jeweiligen Peakmaximum berechnet werden.

16.2. MG-Bestimmung im linearen Saccharose-Gradienten

Es fand die Methode zur Bestimmung der Sedimentationseigenschaften von Enzymen Verwendung (MARTIN und AMES, 1961). Ausgehend von einer leichten (5% Saccharose in 50 mM KP-Puffer, pH 7,0) und einer schweren Saccharoselösung (30% Saccharose in demselben Puffer), wurde mit Hilfe eines Gradientenformers (Modell 570, Fa. Isco, Lincoln, USA) ein linearer Saccharose-Gradient hergestellt, der zu je 13 ml in Cellulose-Nitrat-Zentrifugenröhrchen gefüllt wurde. Vor Gebrauch wurden die Gradienten 4 Std bei 4°C gehalten, um eventuelle Unregelmäßigkeiten durch Diffusion auszugleichen. Die Gradienten wurden überschichtet

mit 0,2 ml einer Enzymlösung, die neben der Hydrogenase auch die Referenzenzyme Katalase, Aldolase und ADH (je 0,25 mg) enthielt. Zentrifugiert wurde 15 Std bei 5°C und einer Drehzahl von 40 000 Upm in einer Christ-Ultrazentrifuge (Modell Omega II, 70 000). Die Gradienten wurden durch Anstechen der Zentrifugenbecher mittels einer Hohlnadel zu je 5 Tropfen (0,13 ml) entnommen und die einzelnen Fraktionen auf ihre Enzymaktivität hin getestet.

17. Flavinisolierung durch Trichloressigsäurebehandlung des Enzyms

0,5 ml Hydrogenaselösung, auf 0°C gebracht, wurde versetzt mit dem gleichen Volumen einer eiskalten 20%igen Trichloressigsäure (TCA)-Lösung. Das Reaktionsgemisch wurde 10 min bei 0°C aufbewahrt. Der Überstand nachfolgender Zentrifugation (5 min bei 5 000 Upm) wurde sofort mit 0,25 ml einer 4 M K_2HPO_4-Lösung neutralisiert. Der so gewonnene Extrakt wurde unmittelbar für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen eingesetzt.

18. Messung von Absorptions- und Fluoreszenzspektren

18.1. Absorptionsspektren

Die spektralen Eigenschaften der in 50 mM KP-Puffer (pH 7,0) gelösten Hydrogenase und die des TCA-Extrakts wurden bei Raumtemperatur in einem Zeiss-Spektralphotometer mit Registrierteil (DMR 21) gemessen und aufgezeichnet. Die Messungen erfolgten bei konstanter Spaltbreite und variabler Wellenlänge (250-600 nm). Bei allen Bestimmungen wurden 0,5 ml-Quarzküvetten (d = 1 cm) verwendet und stets gegen das in der Meßküvette befindliche Lösungsmittel gemessen.

18.2. Fluoreszenzspektren

Die Fluoreszenz der Hydrogenase und des TCA-Extrakts wurde im Hitachi Fluoreszenz-Spektrophotometer 204 mit Xenon Power Supply 150 (Fa. Hitachi, Tokio, Japan) gemessen und mit einem angeschlossenen Schreiber (Servogor RE 511) aufgezeichnet. Die Meßmethode wurde der Hitachi-Arbeitsanleitung entnommen. Nach Ermittlung der Anregungswellenlänge (Excitationsspektrum) wurden die Emissionsspektren im Bereich von 220 bis 700 nm in zylindrischen Küvetten ("Mikrozellen"), die einen Durchmesser von 6 mm und ein Volumen von 0,5 ml hatten, aufgenommen. Die Messungen wurden ebenfalls bei Raumtemperatur durchgeführt.

Eingesetzte Proteinkonzentrationen, sowie Variationen der Versuchs- und Meßbedingungen bei der Aufnahme von Absorptions- und Fluoreszenzspektren sind den Legenden entsprechender Abbildungen zu entnehmen.

19. Chemikalien und Enzyme

Es wurden die handelsüblichen p.a. Chemikalien der Fa. Merck, Darmstadt, verwendet. Die speziellen Chemikalien, Biochemikalien und Enzyme hatten folgende Herkunft:
Fa. C.F. Boehringer und Söhne, Mannheim: AMP, ADP, ATP, NAD, NADH, NADP, NADPH, APAD, FMN, Oxalessigsäure, Cytochrom c, DNase, FDP, GDH: TIM, Katalase, Aldolase, ADH, Chymotrypsinogen A, Ovalbumin.
Fa. Serva Entwicklungslabor, Heidelberg: Acrylamid, Bis, TEMED, DTE, Harnstoff, SDS, Benzylviologen, Methylviologen, Ubichinon Q_6, Riboflavin, APADH, Rinderserumalbumin.
Fa. Merck, Darmstadt: Vitamin K_3, Tiron.
Fa. Sigma Chemical Company, St. Louis, USA: FAD, PMS, Nitroblau-Tetrazolium, Polymyxin B.
Fa. Whatman, Balston Ltd., England: DEAE-Cellulose DE 52.
Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden: Sephadex G-25, Sephadex G-200.
Fa. Bio-Rad, Richmond, Calif., USA: Hydroxylapatit Bio-Gel HT.

EXPERIMENTE UND ERGEBNISSE

A. Vergleichende Untersuchungen an den Hydrogenasen verschiedener Knallgasbakterienstämme

Für die vergleichenden Untersuchungen im ersten Teil dieser Arbeit waren zwei Gruppen von Bakterienstämmen gegenüberzustellen:

1. Die Stämme von A.eutrophus (H16, B19, N9A, G27), einer Art, die bekannt ist als Vertreter derjenigen Wasserstoffbakterien, die über zwei Hydrogenasen verfügen, eine lösliche, NAD-reduzierende Hydrogenase und eine partikelgebundene Hydrogenase unbekannter Acceptorspezifität.
2. Die Stämme verschiedener Gattungszugehörigkeit (Paracoccus denitrificans, Corynebacterium autotrophicum, Pseudomonas facilis), die im Besitz einer partikulären Hydrogenase sind, für die aber bislang kein zur NAD(P)-Reduktion befähigtes Enzym nachgewiesen werden konnte. Zwar wurde bei all diesen Stämmen eine an die lösliche Enzymfraktion des Rohextraktes gebundene Methylenblau reduzierende Aktivität gemessen, diese Aktivität konnte jedoch weder definitiv einer löslichen Hydrogenase zugeordnet werden, noch wurde ein spezifischer, physiologischer H-Acceptor ausfindig gemacht.

Im Vordergrund der vergleichenden Untersuchungen standen die für eine Typisierung der H_2-verwertenden Hydrogenasen entscheidenden Fragen:

1. Besitzt die Hydrogenase die Fähigkeit zur NAD(P)-Reduktion und wie lösen die Organismen, die diese Fähigkeit nicht besitzen, das Problem, die für Syntheseprozesse notwendigen reduzierten Pyridinnucleotide bereitzustellen?
2. Wo ist die Hydrogenase lokalisiert, ist sie löslich oder an Membranen gebunden? Wie ist die Hydrogenaseaktivität in den als "löslich" gekennzeichneten Enzymfraktionen zu charakterisieren? Ist sie zurückzuführen auf im Überstand verblie-

bene Partikel, bedingt durch unzureichende Fraktionierung des Rohextrakts, auf lösliches oder auf solubilisiertes, also ursprünglich partikuläres Enzym?

I. Die Hydrogenasen der Stämme Paracoccus denitrificans, Corynebacterium autotrophicum 7c, C. autotrophicum 14g und Pseudomonas facilis

1. Aktivität der Hydrogenasen im zellfreien Extrakt

1.1. Methylenblaureduktion: H_2-Aufnahmeraten und Reaktionskinetiken

Für die Aktivitätsbestimmungen der Hydrogenase mit Methylenblau (MB) wurden der Stamm RH2 von Pseudomonas palleronii und die schleimfreie Mutante von Stamm 7c hinzugezogen.
Es war ein auffallendes Merkmal der Hydrogenasen aller untersuchten Stämme, daß sie eine hohe, z.T. extrem hohe Aktivität besaßen. Die spezifischen H_2-Aufnahmeraten der Rohextrakte betrugen bei den Stämmen 14g und 7c (Mutante) ca. 1300, bei P.denitrificans 1910, bei 7c-Wildtyp 3140 und bei den beiden Pseudomonaden-Stämmen sogar über 5000 µl/Std · mg Protein. Diese Aktivitäten liegen vergleichsweise zwei- bis achtmal so hoch wie die Raten der partikulären Hydrogenasen der A.eutrophus-Stämme (600-700 µl H_2-Aufnahme/Std · mg Protein).
Von PFITZNER (1972, unveröffentlicht) wurde berichtet, daß eine Mutante von H16, die nur noch in Besitz der partikulären Hydrogenase war, eine dreifach höhere MB-reduzierende Aktivität besaß als der Wildtyp, wenn sie unter autotrophen Bedingungen gewachsen war.
Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, daß die z.B. außergewöhnlich hohen Aktivitäten, die bei den hier getesteten Stämmen aufgetreten sind, bereits als ein erstes Indiz für das Feh-

len einer zweiten NAD-reduzierenden Hydrogenase anzusehen sind. Der Sinn solch immens gesteigerter Aktivität leuchtet ein, wenn man bedenkt, daß die einzelne, zur NAD(P)-Reduktion nicht befähigte Hydrogenase nicht nur die Doppelfunktion erfüllen muß, aktivierten Wasserstoff sowohl für die Knallgasreaktion, als auch für die Gewinnung von Reduktionskraft zu liefern, sondern sie muß auch, weil die Reduktion von NAD notwendig energieabhängig ist, den Elektronentransport mit entsprechend größeren Mengen an Elektronen speisen, um eine hohe Rate der energieliefernden Knallgasreaktion zu gewährleisten.
Ein weiteres beobachtetes Phänomen ist der Zusammenhang zwischen Hydrogenaseaktivität und Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Organismen. Nicht die am schnellsten wachsenden hatten auch die höchste Aktivität, sondern umgekehrt: je langsamer die Zellen wuchsen, desto höher war ihre Hydrogenaseaktivität. Damit in Einklang steht auch die von mir selbst und von PROBST (1975) und SCHINK (pers. Mitteilung) bestätigte Beobachtung, daß die Hydrogenaseaktivität von H16 eine Steigerung erfuhr, wenn die Zellen in die stationäre Wachstumsphase übergingen.
Hohe Hydrogenaseaktivität als Maß für schlechtes autotrophes Wachstum, das scheint ein Widerspruch in sich zu sein, der durch eine bei den verschiedenen Stämmen sicherlich unterschiedlich starke reprimierende Wirkung des Sauerstoffs erklärt werden kann. Dies wird besonders deutlich beim Vergleich der Hydrogenasen von 7c-Wildtyp und seiner schleimfreien Mutante. Die durch die Befreiung vom Schleim bedingte bessere Gewährleistung der O_2-Versorgung der Zellen führte zu einer Aktivitätsminderung der Hydrogenase von über 50%.
Es wäre von Interesse, die diesen Zusammenhängen zugrundeliegende Regulation genauer zu erforschen und neben Sauerstoff auch andere Komponenten auf ihren Einfluß hin zu prüfen.

Der zeitliche Reaktionsverlauf der H_2-Aufnahme im Warburg-Versuch ist in Abbildung 1 dargestellt. Bei den Stämmen RH2, P.facilis und P.denitrificans war er gekennzeichnet durch einen

rasch eintretenden, kontinuierlichen Aktivitätsabfall, der nach 15 min bereits ca. 50% betrug. Die Hydrogenasen von 7c und 14g erwiesen sich als stabiler. Sie konnten ihre Aktivität etwa 10 min konstant halten, ehe sie allmählich abnahm.
Die Inaktivierung von Hydrogenasen durch MB, die zurückgeführt wird auf spontane Oxidation essentieller Gruppen des Proteins, wurde von KING und WINFIELD (1955) zuerst beschrieben und in besonderer Ausprägung bei löslichen Enzymen gefunden.

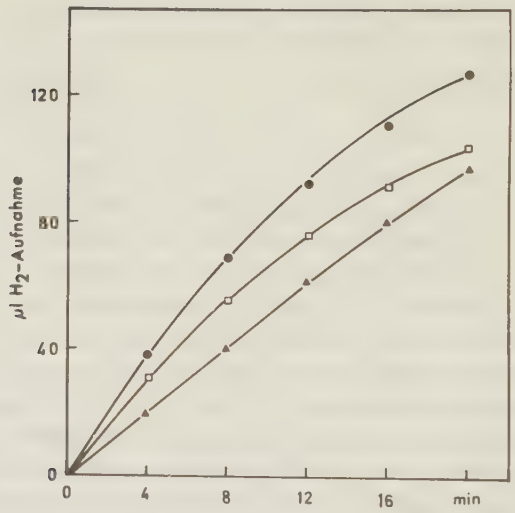


Abb. 1: Zeitlicher Reaktionsverlauf der H_2-Aufnahme

Die Warburggefäße enthielten in 2,2 ml Flüssigkeitsvolumen: Hauptraum: 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,0; 64 µg (P.facilis), 122 µg (P.denitrificans) bzw. 126 µg (Stamm 14g) Protein (Rohextrakt). Seitenarm: 10 µmole MB. Die Reaktion wurde durch Kippen der MB-Lösung in den Hauptraum gestartet. Atmosphäre: 100% H_2; Inkubationstemperatur: 30°C

● P.facilis; □ P.denitrificans; ▲ Stamm 14g

Die lösliche Hydrogenase von H16 zeigte schon nach zweiminütiger Reaktion einen plötzlichen, krassen Aktivitätsabfall (EBERHARDT, 1966), die Reaktion mit Hydrogenasen mehrerer Clostridium-Arten hört sogar schon nach wenigen Minuten ganz auf (v. HUGO, 1973).

1.2. Knallgasreaktion: H_2-Oxidation durch molekularen Sauerstoff

Im Vergleich zur MB-Reduktion lief die Knallgasreaktion bei P.facilis mit 16fach, bei den übrigen Stämmen mit 6-7fach geringerer Rate ab (Tabelle 1). Um diese enorme Diskrepanz der Aktivitäten richtig zu beurteilen, ist zweierlei zu berücksichtigen:

Tab. 1: Spezifische Knallgasaufnahmeraten der Partikelsuspensionen

Stamm	spezif. H_2-Aufnahmerate (µl/Std.mg Prot.)	spezif.Knallgasaufnahmerate (µl/Std.mg Prot.)
P.facilis	12 990	800
P.denitrificans	6 900	1 020
7c	3 280	540
14g	3 400	545

Die Warburggefäße enthielten in 2,2 ml Flüssigkeitsvolumen: 0,067 M Phosphatpuffer, pH 7,0 und Protein (Partikelfraktion P1 des Rohextrakts) in folgenden Konzentrationen: 21 µg (P. facilis), 24 µg (P. denitrificans), 46 µg (7c) und 42 µg (14g). Atmosphäre: 95% H_2; 5% O_2. Inkubationstemperatur: 30°C. Zur Bestimmung der spezifischen H_2-Aufnahmerate wurde MB (10 µmole) als Acceptor eingesetzt. In diesem Falle war die Atmosphäre O_2-frei.

1. EBERHARDT (1965) bestimmte für ganze Zellen von P.facilis einen Q_{H_2,O_2}-Wert von 1712 (Rohextrakt: 320). Für 14g-Zellen wurde eine spezifische Knallgasaufnahme von 2500 µl/Std · mg Prot. (Rohextrakt: 312) berichtet (SCHNEIDER et al., 1973). Diese wesentlich höheren Knallgasaufnahmeraten ganzer Zellen führen zu dem Schluß, daß der größte Teil des membrangebundenen Enzymsystems, das die Knallgasreaktion katalysiert, bereits durch den Ultraschallaufschluß der Zellen zerstört wurde. Die hohe Empfindlichkeit membrangebundener Enzym- und Elektronentransportsysteme gegenüber groben Aufschlußmethoden wie Ultraschall wurde auch in der Arbeit von PROBST (1975) eindrucksvoll nachgewiesen.
2. Hydrogenasen sind als sauerstoffempfindliche Enzyme bekannt. Um den hemmenden Einfluß von O_2 möglichst gering zu halten, wurde ein niedriger Partialdruck gewählt (5%), der wiederum eine geringe Substratsättigung bedeutet. Beide Faktoren, die Hemmwirkung des Sauerstoffs und sein geringer Sättigungsgrad können die Knallgasreaktionsrate herabsetzen.

Diese Aspekte verdeutlichen, daß aufgrund der in der Tabelle aufgeführten Meßdaten nicht mit Exaktheit zu beurteilen ist, ob und wieweit die Geschwindigkeit der Knallgasreaktion durch die terminalen Enzyme des Elektronentransports begrenzt wird, und ob die sehr große Kapazität der Hydrogenase von der Zelle voll ausgeschöpft werden kann.

1.3. Versuche zum Nachweis pyridinnucleotid-reduzierender Aktivität

P.facilis (ATKINSON und McFADDEN, 1954), P.denitrificans (KÜHNEMUND, 1971), die C. autotrophicum-Stämme 7c (TUNAIL und SCHLEGEL, 1974) und 14g (SCHNEIDER et al., 1973) gehören zu der Gruppe von Knallgasbakterien, für die bislang keine NAD-reduzierende Hydrogenase nachgewiesen werden konnte. Trotzdem

ist für keinen dieser Organismen die Möglichkeit ausgeschlossen worden, daß neben der partikulären Hydrogenase eine zweite zur NAD-Reduktion befähigte Hydrogenase in vivo existiert, die als potentiell leicht inaktivierbares und zerstörbares Enzym zur Diskussion steht oder als solches, für dessen NAD-reduzierende Aktivität die notwendigen Reaktionsbedingungen noch nicht ausfindig gemacht worden sind. Letztes hat darüber hinaus als zu diskutierende Möglichkeit ebenso für die bereits nachgewiesenen partikelgebundenen Enzyme selbst zu gelten.
Es ging also darum, durch eine möglichst mannigfaltige Variation der Versuchsbedingungen entweder eine NAD(P)-Reduktion nachweisen zu können, oder die bisherigen und noch in Frage gestellten Aussagen abzusichern und zu untermauern. Es wurden verschiedene Puffersysteme eingesetzt, pH-Werte und Inkubationstemperatur variiert. Der Test wurde durchgeführt in Gegenwart von einzeln oder kombiniert zugesetzten potentiellen Cofaktoren und Elektronenüberträgern (Metallionen, NADH, FMN, FAD, Cytochrom c, MV, BV, MB). Ebenso wurden verschiedene Proteinkonzentrationen und Rinderserumalbumin als möglicher Stabilisator eingesetzt. Unter Berücksichtigung der möglichen partikelstrukturbedingten Behinderung der Substratzugänglichkeit (vgl. Kap. 1.1.) wurden die Versuche teilweise im manometrischen Test unter Warburg-Bedingungen wiederholt.
Alle Versuche führten zu dem gleichen Resultat: Weder Partikel- noch lösliche Fraktionen der Rohextrakte sämtlicher Stämme waren in der Lage, NAD oder NADP zu reduzieren. Auch die Verwendung von Extrakten schonender Zellaufschlüsse (kurze Ultraschalleinwirkung, Behandlung der Zellen mit der Frenchpresse und mit Lysozym unter variierten Bedingungen) brachten kein anderes Ergebnis.

1.4. Energieabhängige NAD-Reduktion und rückläufiger Elektronentransport

Angesichts der vorangegangenen Ergebnisse war es von Interesse zu ergründen, ob der Wasserstoff von einem nicht bekannten, reduzierten Acceptor über einen energieabhängigen Reaktionsprozeß auf das Niveau der Pyridinnucleotide angehoben wird, um auf diese Weise zu der ja notwendigen Reduktionskraft zu gelangen. Nachdem das Phänomen des Elektronentransports gegen das thermodynamische Gefälle zuerst 1957 in Mitochondrien demonstriert wurde (CHANCE und HOLLUNGER), konnten ALEEM et al. 1963 erstmals auch eine energieabhängige NAD-Reduktion in chemoautotrophen Bakterien (Nitrobacter, Nitrosomonas, Ferribacillus) nachweisen, die seitdem wiederholt bestätigt und auch detailliert an verschiedenen Nitrifikanten und Sulfurikanten beschrieben wurde. Eine ATP-abhängige NAD-Reduktion mit molekularem Wasserstoff als H- und Elektronendonator, wie sie bei Rhodopseudomonas capsulata gefunden wurde (KLEMME, 1969), konnte bei Knallgasbakterien bislang nicht nachgewiesen werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten Nachweisversuche mit den durch Ultraschall- und Frenchpressebehandlung gewonnenen Extrakten waren ebenso erfolglos. Die Empfindlichkeit membrangebundener Enzymsysteme, auf die schon in Kapitel 1.2. hingewiesen wurde, ist noch stärker ausgeprägt, wenn ein System wie der rückläufige Elektronentransport an Phosphorylierungsreaktionen bzw. an einen funktionierenden ATPase-Komplex gekoppelt ist. Durch grobe Zellaufschlußmethoden wie Ultraschall-Behandlung werden die die ATPase enthaltenden und auf der Innenseite der Membran liegenden Elementarpartikel ("Knöpfe") sehr leicht abgerissen, was die Zerstörung der Kopplung zur Folge hat (PULLMANN et al., 1960).
Die Unempfindlichkeit gegenüber Lysozym verhinderte, die Zellen von 14g und 7c auf diese Weise schonend aufzuschließen. Bei P.facilis war in Lysozym-Extrakten die Ausbeute an Partikeln zu gering, um membrangebundene Aktivitäten messen zu können. In Extrakten von P.denitrificans dagegen, die nach Aufschluß

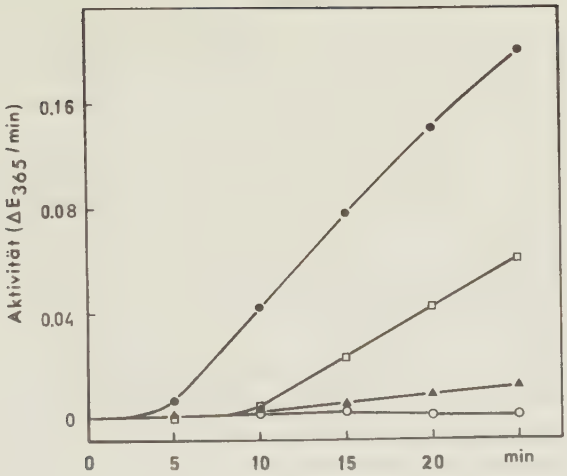


Abb. 2: Energieabhängige NAD-Reduktion im Lysozym-Extrakt von P.denitrificans

Nach Vorbehandlung mit EDTA wurden die Zellen mit Lysozym aufgeschlossen (vgl. "Methoden"), und die Zelltrümmer 10 min bei 3000 g abzentrifugiert. Nach anschließender hochtouriger Zentrifugation bei 100 000 g befand sich die energieabhängige NAD-reduzierende Aktivität im Sediment, die allerdings durch diesen Fraktionierungsvorgang starke Verluste erlitt. Um das empfindliche Enzymsystem zu schonen und um die ohnehin geringe Ausgangsaktivität zu erhalten, wurden die Messungen am unfraktionierten Lysozym-Extrakt durchgeführt. Der Reaktionsansatz (3 ml) enthielt: 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,0; 0,8 mM NAD; $\pm$ 1,6 mM ATP; 1 mM $MgCl_2$ und 1,5 mg Protein.
Inkubationstemperatur: 30°C.

- ● + ATP; Reaktionsgemisch H_2-gesättigt (p_{H_2} = 100%)
- □ - ATP; Reaktionsgemisch Knallgas-gesättigt (p_{H_2} = 95%; p_{O_2} = 5%
- ○ - ATP; Reaktionsgemisch H_2-gesättigt (p_{H_2} = 100%)
- ▲ + ATP; Reaktionsgemisch N_2-gesättigt (p_{N_2} = 100%)

der Zellen mit Lysozym in Gegenwart von Polymyxin B oder nach Vorbehandlung mit EDTA erhalten wurden, konnte tatsächlich in Gegenwart von ATP, $MgCl_2$ und 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) eine nach 5 min einsetzende an Partikeln gebundene NAD-Reduktion gemessen werden (Abbildung 2). Die spezifische Aktivität betrug 4 E/g Protein. Selbst in Abwesenheit von ATP, aber in Gegenwart geringer Sauerstoffmengen, lief diese Reaktion, wenngleich verzögert und mit geringerer Rate auf Kosten der durch die zunächst ablaufende Knallgasreaktion gewonnenen Energie ab. Die auch bei anderen chemoautotrophen Bakterienstämmen beobachtete Reaktionsanlaufphase wurde von ALEEM (u.a. bei Nitrosomonas europaea, 1966) als der Zeitraum gedeutet, in der das ATP in die für den rückläufigen Elektronentransport spezifischen, energiereichen Verbindungen umgewandelt wird.
Im Kontrollansatz ohne Wasserstoff erfolgte keinerlei Reaktion, während unter streng anaeroben Bedingungen und in Abwesenheit von ATP eine geringfügige Reduktion von NAD zu beobachten war, die auf noch endogen vorhandene energiereiche Verbindungen zurückgeführt werden kann. CCCP (0,01 mM) als Entkoppler der Atmungskettenphosphorylierung hemmte die NAD-reduzierende Aktivität um 40%, KCN (1 mM) die an die energiebildende Knallgasreaktion gebundene NAD-Reduktion um ca. 80%.

2. Lokalisierung der Hydrogenasen

Bei folgenden Knallgasbakterien konnte bisher eine als lösliches Enzym identifizierte Hydrogenase nachgewiesen werden: Hydrogenomonas ruhlandii (PACKER und VISHNIAC, 1955), Pseudomonas saccharophila (BONE, 1960), A. eutrophus (WITTENBERGER und REPASKE, 1961; EBERHARDT, 1966), Nocardia opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1973). Alle diese löslichen Hydrogenasen vermögen NAD mit molekularem Wasserstoff zu reduzieren. Es liegt daher nahe, das Fehlen NAD-reduzierender Aktivität auch als Indiz für das Fehlen einer löslichen Hydrogenase anzusehen. Es

ist aber bei allen der hier bearbeiteten Stämme durch die in Kapitel 1.3. zitierten Autoren neben der definitiv partikelgebundenen Hydrogenaseaktivität auch eine an die lösliche Enzymfraktion des Rohextrakts gebundene Methylenblau-reduzierende Aktivität gemessen worden, und es ist denkbar und zumindest für einige Stämme aktuell, diese Aktivität auf eine lösliche Hydrogenase zurückzuführen, die wie die partikulären Hydrogenasen zwar MB, nicht aber Pyridinnucleotide zu reduzieren vermag und deren spezifischer, physiologischer Acceptor noch unbekannt ist. In den bisher vorliegenden Arbeiten ist diese Hydrogenaseaktivität, die in den als "löslich" gekennzeichneten Enzymfraktionen lokalisiert ist, nur sehr unzureichend charakterisiert worden und konnte weder einer löslichen oder solubilisierten, ursprünglich partikulären Hydrogenase zugeordnet, noch definitiv als Restaktivität des partikelgebundenen Enzyms identifiziert werden. Da sich die Untersuchungen auf fraktionierte Zentrifugationen beschränkten, waren die Aussagemöglichkeiten entsprechend begrenzt.
Um bei der Klärung dieser Fragen zu exakteren Aussagen zu kommen, wurden 1. Vergleiche der Aktivitätsverteilung mit dem membrangebundenen NADH-Oxidase-System und der löslichen Malat-Dehydrogenase (MDH) angestellt, 2. der Einfluß milder Zellaufschlußmethoden auf die Hydrogenaselokalisierung geprüft und 3. die Aktivitätsverteilung im diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten untersucht.

2.1. Aktivitätsverteilung der Hydrogenase im Vergleich mit Indikatorenzymen

Nach einstündiger Zentrifugation der Ultraschall (US)-Rohextrakte bei 100 000 g befand sich bei allen untersuchten Stämmen der überwiegende Teil der Hydrogenaseaktivität im Sediment. Die jeweils im Überstand verbliebene Aktivität war unterschiedlich hoch, sie betrug 11,5% bei P.facilis, 14% bei

14g und nahm bei P.denitrificans und 7c mit 33 bzw. 34% doch einen beträchtlichen Teil der Gesamtaktivität ein (vgl. Tabelle 2). Diese Zahlen stimmen mit den in der Literatur angegebenen Werten größenordnungsmäßig überein.
Die Aktivitätsverteilung der MDH und der NADH-Oxidase diente als Indikator für die Qualität der Auftrennung. In Tabelle 2 sind Ergebnisse im einzelnen aufgeführt. Die Partikelfraktionen P1 (100 000 g-Sedimente) waren zu 0-2% vernachlässigenswert mit löslichem Protein verunreinigt. Dagegen waren in den löslichen L1-Fraktionen bei allen Stämmen noch um 30% der NADH-Oxidase zu finden, ein Anteil, der den der Hydrogenasen von 7c und P.facilis sogar noch um ein zwei- bis dreifaches überstieg. Nach weitergehender Fraktionierung der Rohextrakte (3 Std bei 140 000 g) trat die relativ geringe Korrespondenz zwischen Hydrogenasen und NADH-Oxidasen noch deutlicher in Erscheinung: Während die Hydrogenaseaktivität in den löslichen Fraktionen (140 000 g-Überstände) bei allen Organismen mit Ausnahme von 7c, wo ihr Anteil immer noch über 10% betrug, gleich Null war, wies die NADH-Oxidase immer noch deutlich meßbare Restaktivitäten auf. Es zeigte sich andererseits, daß nach solch hochtouriger Zentrifugation sogar schon ein Teil der löslichen MDH im Sediment zu finden ist, der bei den verschiedenen Organismen wahrscheinlich entsprechend differierender Molekulargewichte unterschiedlich hoch war. Wie ist also die in den löslichen Fraktionen lokalisierte NADH-Oxidase-Aktivität zu erklären? Eine Solubilisierung des Komplexes membrangebundenen NADH-Oxidase-Systems kommt nicht in Betracht. Es ist aber bekannt, daß viele Flavoproteine unabhängig vom membrangebundenen Elektronentransport neben einer Diaphorase-, auch NADH-Oxidase-Aktivität besitzen (HÖPNER und TRAUTWEIN u.a., 1972; vgl. auch die beobachtete NADH-Oxidase-Aktivität bei der löslichen Hydrogenase von H16, Kap. 3.9.3.). Darüber hinaus vermögen freie, reduzierte Flavine O_2 nichtenzymatisch mit Pyridinnucleotiden zu H_2O_2 zu reduzieren (DIXON, 1971). Offensichtlich befinden sich in den Rohextrakten lösliche

Tab. 2: Verteilung der Hydrogenase-, NADH-Oxidase- und MDH-Aktivität auf verschiedene Fraktionen des Rohextrakts

Stamm	Fraktion	spezifische Hydrogenaseaktivität ($\mu l H_2$/Std·mg Prot.)	Gesamtaktivität (%)		
			Hydrogenase	NADH-Oxidase	MDH
P.denitrificans	Rohextrakt	1 910	100	100	100
	P1	6 900	61	75	2
	L1	980	33	25	96
	P2	4 100	90	93	30
	L2	0	0	6	65
P.facilis	Rohextrakt	5 190	100	100	100
	P1	12 980	81	67	0,15
	L1	1 180	11,5	30	99
	P2	7 860	93	87	17
	L2	0	0	13	80
14g	Rohextrakt	1 240	100	100	100
	P1	3 400	77	63	1,2
	L1	231	14	31	99
	P2	3 220	95	76	3,5
	L2	0	0	22	92
7c	Rohextrakt	1 350	100	100	100
	P1	3 280	55	63	2
	L1	620	34	31	97
	P2	2 670	77	80	5
	L2	310	13	10	93

Nach Aufschluß der Zellen durch Ultraschall und Abzentrifugation der Zelltrümmer (20 min, 10 000 g) wurden die so gewonnenen Rohextrakte 1 Std bei 100 000 g und 3 Std bei 140 000 g zentrifugiert. Daraus resultierten folgende Fraktionen: P1 = Partikelfraktion 1 (100 000 g - Sediment); P2 = Partikelfraktion 2 (140 000 g - Sediment); L1 = Lösliche Fraktion 1 (100 000 g - Überstand) und L2 = Lösliche Fraktion 2 (140 000 g - Überstand). Für die Hydrogenase gilt der unter Abb. 1 beschriebene Reaktionsansatz. Reaktionsansätze für die Aktivitätsbestimmung der NADH-Oxidase und der MDH sind dem Methodenteil zu entnehmen.

Flavinenzyme, die für einen Teil der gemessenen NADH-Oxidation verantwortlich sind. Da die Zellen aerob aufgeschlossen und die Extrakte aerob zentrifugiert wurden, erscheint die Gegenwart von freien, reduzierten Flavinen und deren Beteiligung an der Reaktion wenig wahrscheinlich.
Das Fehlen jeglicher Hydrogenaseaktivität im 140 000 g-Überstand ist ein erster wichtiger Hinweis für den ausschließlich partikulären Charakter der Hydrogenasen von 14g, P.denitrificans und P.facilis. Dennoch ist eine endgültige Aussage nicht möglich, zum einen, weil bei den angewandten Zentrifugationsbedingungen auch schon lösliche Enzyme höheren Molekulargewichts sedimentieren können, zum anderen, weil sich die NADH-Oxidase als ein nur sehr bedingt taugliches Indikatorenzym erwiesen hat.
Eine Sonderstellung nimmt zunächst die Hydrogenase von 7c ein. Sie konnte auch durch mehrstündiges Zentrifugieren nicht vollständig zum Sedimentieren gebracht werden. Andererseits ist sie die einzige Hydrogenase, deren Aktivitätsverteilung sich mit der der NADH-Oxidase deckt. Die Hydrogenase der schleimfreien Mutante von 7c unterschied sich in ihrem Verhalten nicht von der des Wildtyps.
Die Lokalisierung der Hydrogenaseaktivität bei Pseudomonas palleronii RH2 war nahezu identisch mit der, die bei P.facilis gefunden wurde.

2.2. Einfluß milder Zellaufschlußmethoden auf Enzymausbeute und Aktivitätsverteilung

Die Anwendung milder Zellaufschlußmethoden hatte den Sinn, die Bildung von Artefakten, wie sie Membranfragmente und solubilisierte Enzyme darstellen, zu vermeiden und für die Fraktionierungsversuche nach Möglichkeit intakte Membranen einzusetzen. Folgende Methoden wurden angewandt: kurze US-Einwirkung auf die Zellen; Aufschluß durch die Frenchpresse; mehrmaliges Einfrieren und Auftauen der Zellen; Lysozymbehandlung der Zellen

in Gegenwart und Abwesenheit von EDTA; Lysozymwirkung auf EDTA-vorbehandelte Zellen und Lysozymaufschluß in Gegenwart von Polymyxin B.
Mit Hilfe dieser Methoden konnten die Hydrogenasen von P.denitrificans und 14g als ausschließlich an Partikeln gebunden charakterisiert werden.

Für P.denitrificans wurde der Nachweis durch zwei Resultate erbracht:

1. Allein durch achtmaliges Einfrieren und Auftauen der Zellen wurden ca. 10%* des Gesamtproteins herausgelöst. Obwohl bei einer solchen Proteinausbeute angesichts der hohen Volumenaktivität der löslichen Fraktion nach US-Aufschluß (über 11 000 µl H_2-Aufnahme/Std·ml) ein lösliches Protein hätte leicht nachweisbar sein müssen, war die Aktivität einer solchen Extraktpräparation, auch wenn die bis zu zehnfache Menge Extrakt eingesetzt wurde, absolut Null. Die Unempfindlichkeit der Hydrogenase gegenüber Einfrieren und Auftauen in der löslichen Fraktion des US-Extraktes war zuvor getestet worden. Der Aktivitätsanteil (Ausbeute etwa 15%) der löslichen MDH im Extrakt entsprach den Erwartungen.
2. Wurde der durch Lysozym- und Polymyxin B-Behandlung erhaltene Extrakt, der 20% der Hydrogenaseaktivität des US-Extraktes enthielt, fraktioniert zentrifugiert, so befand sich schon nach 1 Std bei 100 000 g die gesamte Aktivität im Sediment.

Sehr ähnliche Ergebnisse erhielt man, wenn die Zellen von C. autotrophicum 14g 2 sec/ml mit US behandelt wurden (Ausbeuten: Gesamtprotein: 25%; partikuläre Enzyme: 15%). Die im 100 000 g-Überstand verbliebene Restaktivität von 0,5% konnte vernachlässigt werden. Sie war so gering, daß sie selbst bei Einsatz größerer Extraktmengen manometrisch kaum erfaßbar war.
Die Zellen von 14g erwiesen sich als völlig unempfindlich gegenüber Lysozym. Um so erstaunlicher war, daß durch achtmali-

* Alle im folgenden angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf Ausbeuten (= 100%) im Rohextrakt.

ges Einfrieren und Auftauen der Zellen 14% lösliches Protein (Indikator: MDH) extrahiert werden konnten. Trotzdem konnte, wie schon bei P.denitrificans, keine lösliche Hydrogenase, die in der Lage gewesen wäre, MB zu reduzieren, nachgewiesen werden.

Am Beispiel von P.denitrificans und 14g konnte die außerordentliche Effektivität gerade dieser einfachsten Methode des Einfrierens und Auftauens von Zellen demonstriert werden. Dabei ist die relativ geringe, aber für den Zweck dieser Untersuchungen ausreichende Proteinausbeute von sekundärer Bedeutung. Kein anderer Zellaufschluß gewährleistete eine bessere Auftrennung von löslichem und membrangebundenem Protein. Beim Vorgang des Einfrierens werden die Zellen nicht im üblichen Sinn aufgebrochen, sondern von Eiskristallen durchlöchert. Von der Perforierung bleiben auch durch Lysozym nicht angreifbare Kapselsubstanzen oder Zellwandhüllen nicht verschont. Durch die perforierte Zellwand vermögen zwar lösliche Enzyme nach außen zu dringen, sie bleibt aber unpassierbar für Membranteile und Partikel.

Die Zellwand der Zellen von C.autotrophicum 7c erwies sich als die resistenteste. Auch gegenüber der schleimfreien Mutante war Lysozym völlig wirkungslos und selbst mehrmaliges Einfrieren und Auftauen vermochte nur unzulängliche Mengen Protein (1,5%) herauszulösen. Der Aufschluß durch die Frenchpresse (FP) war das für 7c geeignetste Verfahren. Der Extrakt enthielt 59% der Hydrogenasegesamtaktivität. Die Verteilung der Aktivität auf die verschiedenen Fraktionen wich deutlich von der der anderen Stämme ab und unterstrich die in Kapitel 2.1. schon betonte Sonderstellung der 7c-Hydrogenase: Im 100 000 g-Überstand befand sich über die Hälfte (53%) der Aktivität und im 140 000 g-Überstand waren immer noch 40% lokalisiert. Diese Anteile lagen prozentual sogar noch wesentlich höher als die Aktivitäten in den löslichen Fraktionen des US-Extrakts (vgl. Tab. 2). Geht man von der Annahme aus, daß durch mildere Aufschlußmethoden die teilweise Ablösung der Enzyme von den Membranen und die Zerstörung von größeren Membranteilen in kleine Partikel, also die Artefaktbil-

dung, vermieden oder zumindest eingeschränkt wird und infolgedessen die ursprünglich von Partikeln herrührende Aktivität in löslichen Enzymfraktionen verringert werden müßte, dann überrascht das genau entgegengesetzte Ergebnis bei 7c und macht für diesen Stamm die Frage der Existenz einer zweiten, löslichen Hydrogenase besonders aktuell. TUNAIL (1973) beobachtete beim Vergleich der Aktivitäten von US- und FP-Extrakt den gleichen Effekt, der sich nur entsprechend unterschiedlicher Fraktionierungsbedingungen größenordnungsmäßig unterschied.

P.facilis hebt sich von den anderen Stämmen durch seine offensichtlich geringe Zellwandresistenz und leichte Aufschließbarkeit ab. Obwohl mit verschiedenen milden Aufschlußmethoden eine 40-50%ige Proteinausbeute gelang und eine nahezu maximale Ausbeute löslicher Enzyme, blieb der Gehalt der Hydrogenase auf einem stets sehr niedrigen Niveau (1-5%). Ist dieses Ergebnis auch ein starkes Indiz dafür, daß auch die Hydrogenasen von P. facilis allein an Partikeln, in diesem Fall an schwer freisetzbare Partikel gebunden vorliegt, so sollte doch für diesen Stamm, ebenso wie für 7c, die Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation in einer Ultrazentrifuge letzte Klarheit über die Hydrogenaselokalisierung bringen.

2.3. Verteilung der Hydrogenaseaktivität im diskontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten

2.3.1. C.autotrophicum 7c

Einerseits wurde Aktivitätsverteilung der Hydrogenase des US- und des FP-Extrakts einander gegenübergestellt und andererseits mit dem Verhalten von Referenzenzymen (MDH, Katalase, NADH-Oxidase) verglichen. Die diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation wurde der kontinuierlichen vorgezogen, weil durch den Einbau von Stufen die Auftrennung uneinheitlicher, von Grö-

ße, Gestalt und Dichte her heterogen beschaffener Partikel in einzelne Fraktionen besser gewährleistet ist.
Folgende Ergebnisse weisen eindeutig den auch bei 7c 100% partikulären Charakter der Hydrogenase nach und machen gleichzeitig die hohen, irreführenden Aktivitäten, die in den löslichen Enzymfraktionen gefunden worden waren, erklärlich:

1. Nach US-Aufschluß war die Hydrogenaseaktivität an Partikeln sehr unterschiedlicher Beschaffenheit gebunden und verteilte sich über den gesamten Gradienten (Abbildung 3).
   In der 70%igen (Sediment), der 60%igen und in der 40%igen Saccharosestufe, also in Konzentrationsbereichen, in die keine löslichen Proteine eindringen, bildeten sich drei distinkte Partikelfraktionen heraus, in denen die Hydrogenase angereichert vorlag. Im Überstand kam es nicht zur Ausbildung eines Aktivitätspeaks. Die hier gemessene Aktivität, die lediglich 1% der Gesamtaktivität ausmachte, war als eine auf Verschmierungseffekte zurückführende Aktivitätsverschleppung anzusehen.
2. In Kapitel 2.1, wurde bereits erwähnt, daß von den getesteten NADH-Oxidasen das Enzymsystem von 7c das einzige ist, deren Aktivitätsverteilung sich mit der Lokalisierung der Hydrogenase deckt. Der nahezu identische Aktivitätsverlauf von NADH-Oxidase und Hydrogenase im Saccharose-Dichtegradienten (Abbildung 3) bestätigt einerseits die NADH-Oxidase von 7c als gut funktionierendes, partikuläres Indikatorenzym und liefert andererseits einen weiteren wichtigen Nachweis für die ausschließliche Partikelgebundenheit der Hydrogenase.
3. Die Hydrogenaseaktivitätsverteilung des FP-Extrakts unterschied sich grundlegend von der des US-Extrakts. Ein Vergleich der Aktivitätskurven ist in Abbildung 4b wiedergegeben. Die Hydrogenase im FP-Extrakt war offensichtlich an eine recht homogene Partikelfraktion gebunden, die sich in der unteren Hälfte der 40%igen Saccharose anreicherte und sich als starker, symmetrischer Aktivitätspeak ausprägte. Ein Sediment und eine Aktivitätsbande im 50-60%-Bereich fehlten.

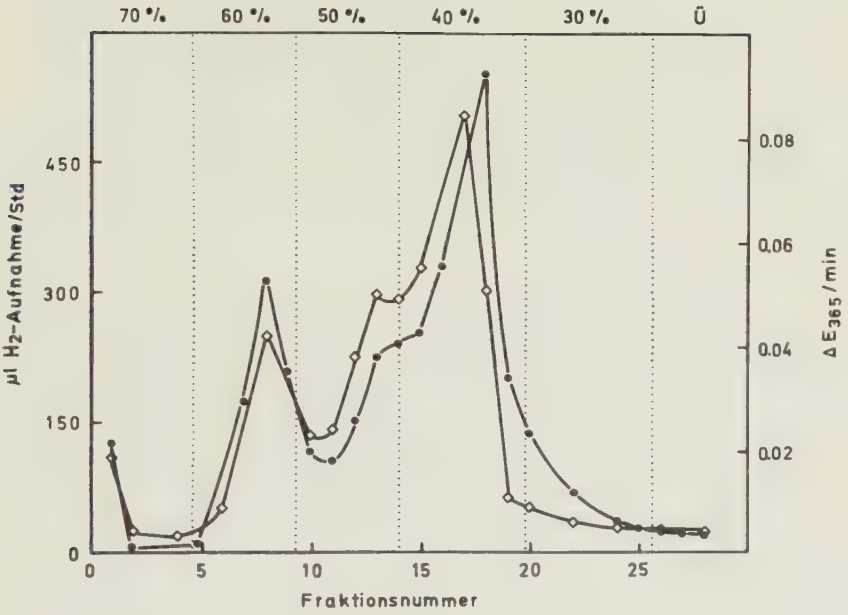


Abb. 3: Verteilung der Hydrogenase- und NADH-Oxidase-Aktivität im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten nach Aufschluß der Zellen von C.autotrophicum 7c durch Ultraschall.

In einem Zentrifugenröhrchen aus Cellulose-Nitrat wurden je 2 ml einer 70-, 60- und 50%igen und je 2,5 ml einer 40- und 30%igen Saccharose-Lösung übereinandergeschichtet. Auf die oberste Saccharoseschicht (30%) wurde vorsichtig 1 ml Rohextrakt (US-Extrakt) aufgetragen. Das Gesamtvolumen betrug 12 ml. Der Gradient wurde 16 Std bei 26 000 Upm und 5°C in einer Beckmann-Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach Durchstechen des Röhrchenbodens mittels einer Hohlnadel wurden Fraktionen zu je 15 Tropfen (0,43 ml) entnommen, deren Enzymaktivitäten anschließend bestimmt wurden.

● Hydrogenase; ◇ NADH-Oxidase

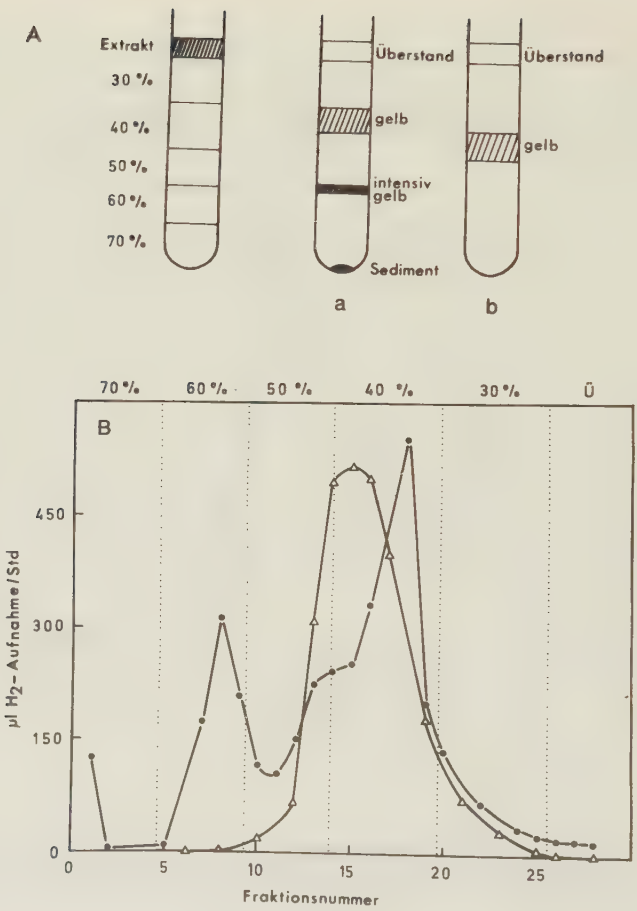


Abb. 4: Ultraschall- und Frenchpresse-Extrakt im Vergleich: Bandierung (A) und Aktivitätsverlauf (B) der Hydrogenase von C.autotrophicum 7c im Saccharose-Gradienten.

Die Präparation des Zentrifugenröhrchens und die Ultrazentrifugation wurden wie unter Abb. 3 angegeben, durchgeführt.

A: a US-Extrakt; b FP-Extrakt
B: ● US-Extrakt; △ FP-Extrakt

Auch im Überstand war, und das ist für die Charakterisierung der Hydrogenase besonders bedeutsam, keinerlei Aktivität meßbar.

4. Einen weiteren und letzten Nachweis für das Fehlen einer löslichen Hydrogenase lieferte die deutliche Auftrennung zwischen hydrogenasegebundener Aktivität und den getesteten, löslichen Referenzenzymen, der zelleigenen MDH und der zugesetzten, hochmolekularen Katalase aus Rinderleber (MG = 240 000), die bereits in der unteren Hälfte der 20%igen Saccharose bandierte (Abbildung 5).

Wie sind nun diese starken Differenzen in der Aktivitätsverteilung der einzelnen Extrakte zu erklären? Wie kommt es, daß gerade nach Aufschluß der Zellen mit Ultraschall, der doch Membranen in stärkerem Maße als etwa die Frenchpresse zerstören, zersetzen, fragmentieren kann, Extrakte gewonnen werden, die Partikel solcher Größe und Schwere enthalten, daß sie bis in die 60-70%ige Saccharose vorzudringen vermögen, und wie kommt es, daß ein FP-Aufschluß, der zumindest eine größere Unversehrtheit der Membrane erwarten läßt, zwar relativ einheitliche, aber kleine, schwer sedimentierende Partikel freisetzt?
Bei den Partikeln, die sich in den höherprozentigen Saccharosestufen anreichern, handelt es sich um verunreinigte Fraktionen, d.h. um Partikel, die mit Zellwandresten assoziiert sind. Es ist anzunehmen, daß diese Cytoplasmamembran-Zellwand-Assoziationen durch US-Behandlung so zerkleinert werden, daß sie bei der Abzentrifugation der Zelltrümmer eigene hydrogenasehaltige Fraktionen bilden. Diese Vorstellung wird unterstützt durch eine interessante, zunächst widersprüchlich erscheinende Beobachtung: Das Sediment und die im Grenzbereich zwischen 50- und 60%iger Saccharose liegende Bande waren intensiv gelb gefärbt, die Hauptaktivität der Hydrogenase aber war in der kaum sichtbaren, schwach gelblich-braunen Bande im niederkonzentrierten Saccharose-Bereich lokalisiert (Abbildung 4a). Wie ist diese Diskrepanz zu erklären? 1971 wurden von EBERHARDT partikuläre

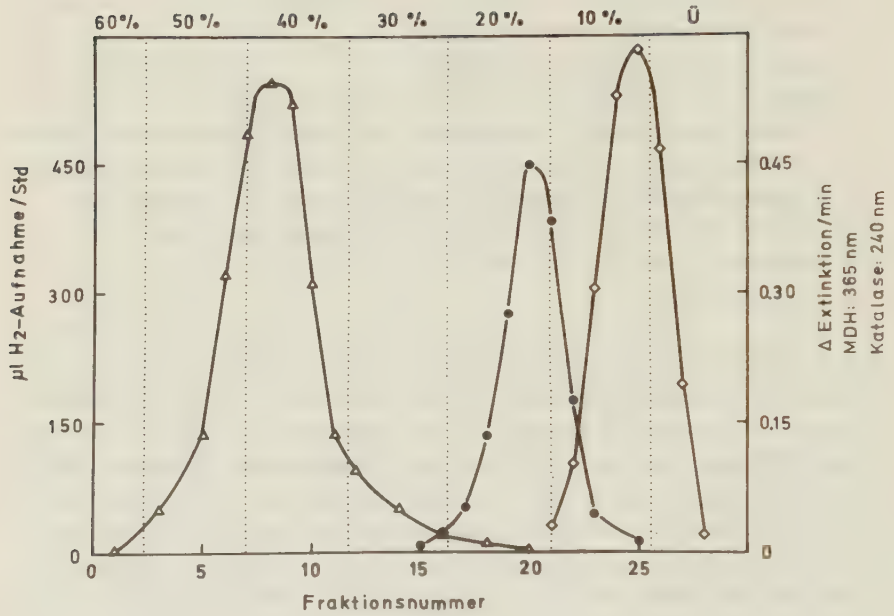


Abb. 5: Auftrennung zwischen partikulärer Hydrogenase und löslichen Referenzenzymen im Saccharose-Gradienten

Gegenüber der unter Abb. 3 beschriebenen Versuchsbedingungen wurden folgende Änderungen vorgenommen: Um auch den löslichen Enzymen ein Bandieren im Gradienten zu ermöglichen, wurden der 30%-Saccharosestufe zwei weitere Stufen niederer Konzentration (20 und 10%) vorgeschaltet. Die Volumina der einzelnen Saccharoseschichten betrugen je 2 ml (10-50%ige Sucrose) bzw. 1 ml (60%ige Sucrose). Im Rohextrakt (FP-Extrakt) wurden, bevor er auf den Gradienten aufgetragen wurde, einige Katalase-Kristalle gelöst.

△ Hydrogenase; ● Katalase; ◇ MDH

Fraktionen und Zellwandpräparate von 12/60/x analysiert, einem Knallgasbakterienstamm, der wie 7c grampositiv, lysozymempfindlich und gelbpigmentiert ist. EBERHARDT fand, daß der Hauptanteil der Carotinoide nicht mit der Cytoplasmamembran, sondern mit der Zellwand assoziiert ist. Gehen wir davon aus, daß auch die Pigmente von 7c vorwiegend Komponenten der Zellwand sind, dann leuchtet ein, daß gerade die durch ihre Farbintensität auffallende Bande, in der mit Zellwandteilen assoziierte Membranen angereichert vorliegen, proteinarm ist und relativ schwache Enzymaktivität aufweist. Die Farbintensität von Partikelfraktionen kann somit geradezu als optischer Indikator für den Grad der Verunreinigung mit Zellwandresten dienen.
Das Fehlen großer, leicht sedimentierender und intensiv gelb gefärbter Partikel im FP-Extrakt spricht für die Reinheit und Homogenität der Partikel in dieser Extrakt-Präparation. Die geringe Sedimentationsfähigkeit ist als Charakteristikum der nicht oder nur wenig verunreinigten Partikel von 7c anzusehen. Sie führt in den "löslichen" Enzymfraktionen zu irreführenden hohen Aktivitäten, die die Existenz einer löslichen Hydrogenase vortäuschen.

2.3.2. P.facilis

Die Hauptmasse der Hydrogenase von P.facilis, sowohl des US-, wie des FP-Extrakts, reicherte sich nach Ultrazentrifugation des Saccharose-Gradienten in der 50%igen Saccharose an (Abbildung 6). Die Aktivität fiel in ihrem Maximum in Richtung höherer Saccharosekonzentrationen steil, in Richtung niederer Konzentrationen langsam und ungleichmäßig ab. Wurde der US-Extrakt als Probe eingesetzt, so trat im Bereich löslicher Enzyme (zwischen 0 und 30% Saccharose; vgl. Indikatorpeak der Katalase in Abbildung 6) ein kleiner, aber deutlich erkennbarer peak auf, wurde dagegen FP-Extrakt eingesetzt, verschwand dieser peak zugunsten einer Aktivitätssteigerung in den Fraktionen, in denen

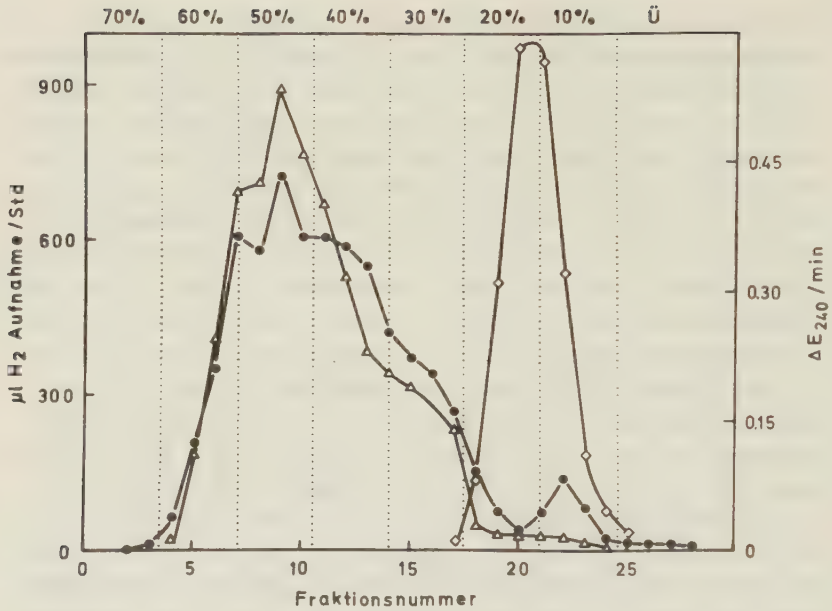


Abb. 6: Aktivitätsverteilung der Hydrogenase von P.facilis im diskontinuierlichen Saccharose-Gradienten

Je 1,5 ml der zwischen 10 und 70% konzentrierten Saccharose-Lösungen wurden in Cellulose-Nitrat-Röhrchen übereinandergeschichtet. Die weiteren Versuchsbedingungen entsprachen den unter Abb. 3 angegebenen.

- ● Hydrogenase (US-Extrakt)
- △ Hydrogenase (FP-Extrakt)
- ◇ Katalase

die partikelgebundene Hydrogenase angereichert vorlag. Dieses Resultat kann als Nachweis dafür gewertet werden, daß P.facilis ebenfalls über keine lösliche Hydrogenase verfügt, daß aber US-Behandlung die Ablösung eines Teils der Hydrogenase von den Membranen bewirkt. ATKINSON und McFADDEN (1954) berichteten,

daß durch Beschallung großer Partikel von P.facilis die Aktivität der Hydrogenase gesteigert und die Sedimentationsfähigkeit vermindert wurde. Es fehlte jedoch der schlüssige Nachweis für die Löslichkeit oder Solubilisierung eines Enzyms.
Das Gesamtkurvenbild der Hydrogenaseaktivität, die Breite und Asymmetrie der Hauptbande (vgl. Abbildung 6), sprechen, anders als bei 7c, für die Heterogenität der Partikel. Die Behandlung mit der Frenchpresse stellt für die leicht aufbrechbaren Zellen von P.facilis offenbar keinen in dem Maße schonenden Aufschluß dar, um die Bildung von Artefakten ganz zu vermeiden.

3. Stabilität der Hydrogenasen

Das Stabilitätsverhalten der Hydrogenasen aller Stämme ist sehr ähnlich. Es wird in Abbildung 7 am Beispiel des P.facilis-Enzyms demonstriert.
Unter H_2 erwiesen sich alle Hydrogenasen als sehr stabil. Ausnahmslos stieg die Aktivität im Verlauf der ersten Wochen sogar leicht an. Nach 10 Wochen besaßen die Hydrogenasen von 7c und P.facilis eine Aktivität von immer noch knapp über 100%.
Auch bei Aufbewahrung unter Luft zeigten die Hydrogenasen ähnliches Verhalten. Einem raschen Aktivitätsabfall während der ersten 1-2 Wochen, der größenordnungsmäßig zwischen 45 und 65% lag, folgte die lange Phase konstanter oder sehr allmählich abfallender Aktivität.
Gegenüber Kälte (-20°C) erwiesen sich die Enzyme mit Ausnahme der 7c-Hydrogenase als sehr unempfindlich. Als ausgesprochen resistent kann die Hydrogenase von P.denitrificans gelten. Auch die Enzyme von P.facilis und 14g sind recht stabil: Sie erlitten nach längerer Aufbewahrung im eingefrorenen Zustand nur geringfügige Aktivitätsverluste. Die Hydrogenase von 7c ist etwas kältelabiler. Sie büßte nach 7 Tagen bei -20°C unter H_2 die Hälfte, nach zehnmaligem Einfrieren und Auftauen 25% seiner Ausgangsaktivität ein (der Aktivitätsverlust der anderen Hydrogenasen nach dieser Prozedur betrug nur 0-10%).

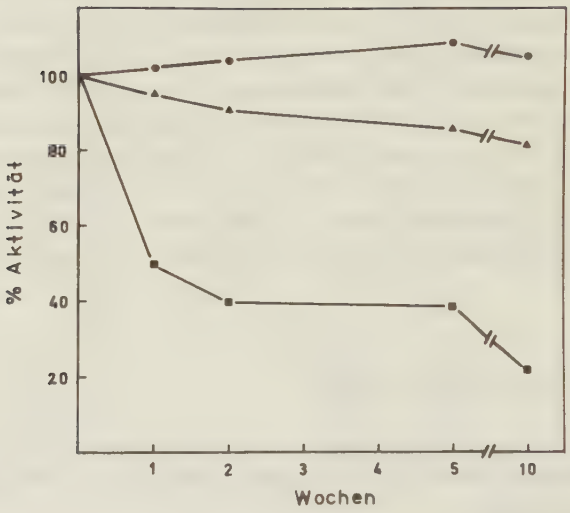


Abb. 7: Stabilität der Hydrogenase von P.facilis

Der Rohextrakt eines US-Aufschlusses wurde 1 Std bei 100 000 g zentrifugiert. Das Sediment wurde einmal mit 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0) gewaschen und in demselben Puffer homogen resuspendiert. Die Partikelsuspension (Proteingehalt: 7,2 mg/ml) wurde in gleiche Portionen aufgeteilt und unter verschiedenen Bedingungen aufbewahrt. Die Aktivitätsänderungen wurden über einen Zeitraum von 10 Wochen verfolgt.

- ● Aufbewahrung bei 4°C unter H_2
- ▲ Aufbewahrung bei -20°C unter H_2
- ■ Aufbewahrung bei 4°C unter Luft

II. Die Hydrogenasen der Hydrogenomonas eutropha-Stämme H16, B19, N9A und G27

1. Nachweis einer partikelgebundenen und einer löslichen Hydrogenase

Für die Stämme B19, N9A und G27 konnte die bei H16 schon von EBERHARDT (1966) beobachtete Existenz zweier verschiedener Hydrogenasen nachgewiesen werden: einer löslichen, NAD-reduzierenden und einer partikulären Hydrogenase, die MB, aber keine Pyridinnucleotide zu reduzieren vermag. Die Verteilung NAD- und MB-reduzierender Aktivität ist in Tabelle 3 dargestellt.
Nach fraktionierter Zentrifugation (1 Std. bei 100 000 g) war die NAD-reduzierende Hydrogenase streng an die lösliche Fraktion des durch US-Aufschluß erhaltenen Extrakts gebunden. Die NAD-Reduktion konnte photometrisch aber auch manometrisch im Warburg-Versuch nachgewiesen werden. In den gewaschenen Partikeln war keinerlei Aktivität mehr meßbar.
Da beide Hydrogenasen, die lösliche und die partikuläre, in der Lage sind, Methylenblau zu reduzieren, ließ sich die MB-reduzierende Aktivität nicht allein in einer Fraktion lokalisieren. Bei B19 und N9A war der überwiegende Teil der Aktivität (55-60%) in der löslichen Fraktion wiederzufinden, bei G27 war die Aktivität auf die Fraktionen etwa gleich verteilt, während bei H16 68% der Aktivität in den Partikeln lokalisiert waren.
Die durch einstündige Zentrifugation bei 100 000 g erreichte Auftrennung in Partikel und löslichen Überstand ist qualitativ nicht zu verbessern, weil bei noch höhertouriger Zentrifugation auch die lösliche Hydrogenase zu sedimentieren beginnt. Zwar war bei keinem der Stämme der 100 000 g-Überstand vollständig partikelfrei, aufgrund der Unfähigkeit der Partikel aber, NAD zu reduzieren, ließen sich dennoch die partikuläre und die lösliche Hydrogenase gut getrennt voneinander charakterisieren.

Tab. 3: Spezifische Aktivitäten und Aktivitätsverteilung der Hydrogenasen, sowie der Indikatorenzyme MDH und NADH-Oxidase

Stamm	Fraktion	spezifische MB-red. Aktivität (µl H_2/Std·mg Prot.)	spezifische NAD-red. Aktivität (µl H_2/Std·mg Prot.)	Gesamtaktivität (%)			
				MB-Red.	NAD-Red.	MDH	NADH-Oxidase
N9A	Rohextrakt	1 700	474	100	100	100	100
	Lösl.Fraktion	1 400	586	60	88	99	44
	Partikel	2 440	0	37	0	0,1	52
B19	Rohextrakt	1 740	381	100	100	100	100
	Lösl.Fraktion	1 590	383	56	61	99	34
	Partikel	2 530	0	40	0	0,1	63
G27	Rohextrakt	1 100	490	100	100	100	100
	Lösl.Fraktion	860	635	41	77	95	27
	Partikel	1 920	0	49	0	0,1	71
H16	Rohextrakt	1 340	360	100	100	100	100
	Lösl.Fraktion	720	511	29	87	99	42
	Partikel	2 300	0,8	68	0,1	0,3	59

Die durch US erhaltenen Rohextrakte wurden 1 Std bei 100 000 g fraktioniert zentrifugiert. Rohextrakte, lösliche Fraktionen und Partikelsuspensionen wurden zur Enzymaktivitätsbestimmung eingesetzt. Die spezifischen Aktivitäten wurden manometrisch als H_2-Aufnahme gemessen. Die Aktivitätsverteilung der MDH, der NADH-Oxidase und auch der NAD-Reduktion wurden, um auch sehr geringe Aktivitäten erfassen zu können, photometrisch bestimmt (vgl. "Methoden").

2. Eigenschaften der löslichen Hydrogenasen

2.1. NAD- und MB-Reduktion: Vergleich ihrer Reaktionsraten und -kinetiken

Um die Reaktionsraten der MB- und NAD-Reduktion unmittelbar miteinander vergleichen zu können, wurden beide manometrisch als H_2-Aufnahme bestimmt (Tabelle 3). Die spezifische NAD-reduzierende Aktivität in Rohextrakt (360-490 µl H_2/Std·mg Protein) und löslicher Fraktion (380-635 µl/ Std·mg Protein) lag bei allen Stämmen annähernd innerhalb einer Größenordnung. In der Rate der MB-Reduktion unterschieden sie sich dagegen erheblich. Während sich bei H16 und G27 die spezifischen Hydrogenase-Aktivitäten hinsichtlich NAD- und MB-Reduktion in etwa entsprachen, lagen bei N9A und B19 die spezifischen H_2-Aufnahmeraten mit MB als H-Acceptor 2,4 bzw. 4,1fach höher.
Ein sichtbarer Zusammenhang bestand zwischen der Aktivitätsdiskrepanz von MB- und NAD-Reduktion einerseits und der stimulierenden Wirkung von katalytischen Mengen (5 µm) FMN andererseits. So erfuhr die Hydrogenase von B19, bei der diese Diskrepanz am stärksten in Erscheinung trat, auch durch FMN die stärkste, nämlich eine 300%ige Beschleunigung der NAD-Reduktion (Abbildung 8a), deren Rate sich damit der der MB-Reduktion näherte. Die Hydrogenase von N9A wurde durch FMN zweifach aktiviert, während die Enzyme von H16 und G27 über eine 15-20%ige Aktivitätssteigerung nicht hinauskamen. Die MB-Reduktion wurde in keinem Fall von FMN beeinflußt. Möglicherweise spielt FMN bei der NAD-Bindung eine essentielle Rolle als Cofaktor, der sich von Stamm zu Stamm nur in seiner Bindungsfestigkeit unterscheidet. Schon WITTENBERGER und REPASKE (1961) bestimmten für die lösliche Hydrogenase von A.eutrophus eine doppelt so hohe MB- wie NAD-Reduktionsrate, für die sie keine Erklärung hatten. Ein Zusammenhang mit der Wirkung von FMN wurde nicht aufgedeckt.

Die Reaktionskinetiken sind bei den Hydrogenasen aller Stämme identisch. In Abbildung 8 sind am Beispiel von B19 die NAD- und

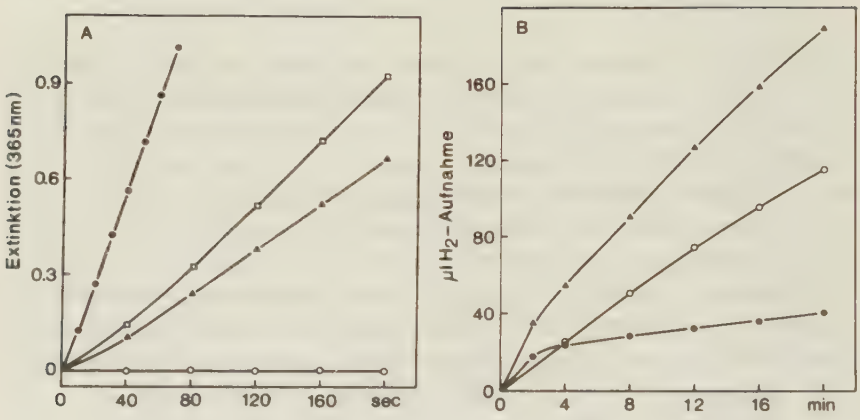


Abb. 8: NAD-(A) und Methylenblaureduktion (B) durch zellfreie Extrakte von A.eutrophus B19

A: Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0; H_2-gesättigt); 0,8 mM NAD; Protein: 1,34 mg (Rohextrakt), 0,81 mg (lösliche Fraktion) und 0,76 mg (Partikel).
Inkubationstemperatur: 30°C

- □ Rohextrakt
- ▲ Lösliche Fraktion
- ○ Partikelsuspension
- ● Lösliche Fraktion in Gegenwart von 5 µM FMN

B: Die Warburggefäße enthielten in 2,2 ml Flüssigkeitsvolumen: Hauptraum: 0,067 M Phosphatpuffer (pH 7,0); Protein: 0,536 mg (Rohextrakt), 0,324 mg (lösliche Fraktion) und 0,150 mg (Partikel). Seitenraum: 10 µmole MB. Die Reaktion wurde durch Kippen der MB-Lösung in den Hauptraum gestartet.
Inkubationstemperatur: 30°C; Atmosphäre: 100% H_2

- ▲ Rohextrakt
- ● Lösliche Fraktion
- ○ Partikelsuspension

die MB-Reduktion (in Abhängigkeit von der Zeit) einander gegenübergestellt.
Die NAD-Reduktion (Abbildung 8a) ist gekennzeichnet durch eine Anlaufphase, auf die im zweiten Teil der Arbeit bei der Behandlung der löslichen Hydrogenase von H16 näher eingegangen wird (Kapitel B, 3.2.). Die starke Methylenblau-Empfindlichkeit löslicher Hydrogenasen, die bereits in Kapitel I. 1.1. erwähnt worden war, konnte auch für die löslichen Enzyme aller A.eutrophus-Stämme bestätigt werden. Nach Zusatz von MB in den Reaktionsansatz startete die Reaktion zwar sofort, nach 2-3 min jedoch erfolgte ein krasser Aktivitätsabfall auf 1/4 bis 1/5 der Ausgangsaktivität (Abbildung 8b).

2.2. Stabilität der Enzyme

Hinsichtlich ihres Stabilitätsverhaltens unterscheiden sich die löslichen Hydrogenasen der verschiedenen Stämme erheblich. Besonders die Hydrogenase von H16 zeigt gegenüber den anderen Enzymen abweichendes Verhalten.
Bei längerer Aufbewahrung im eingefrorenen Zustand unter H_2 waren die Hydrogenasen von N9A, B19 und G27 stabil (Abbildung 9). Nach anfänglichem Aktivitätsverlust blieb die Aktivität dann auch mehrere Wochen konstant (B19, G27), oder stieg sogar an (N9A). Bei Aufbewahrung der Extrakte bei $4^{\circ}C$ unter H_2 waren die Enzyme anfangs stabiler als im eingefrorenen Zustand, konnten aber ihre Aktivitätskonstanz nicht über mehrere Wochen halten. Die lösliche Hydrogenase von H16 dagegen konnte weder durch molekularen Wasserstoff stabilisiert noch durch Einfrieren vor starken Aktivitätsverlusten geschützt werden.
Als ausgesprochen instabil erwiesen sich die Enzyme von G27, B19 und N9A unter Luft, in Abwesenheit von H_2. Innerhalb weniger Tage verloren sie die gesamte Aktivität. Konträr dazu verhielt sich wiederum die Hydrogenase von H16. Trotz der auch unter diesen Bedingungen bestehenden Instabilität besaß das Enzym nach 2 Wochen immerhin noch 50%, nach 5 Wochen noch 25% seiner Ausgangsaktivität.

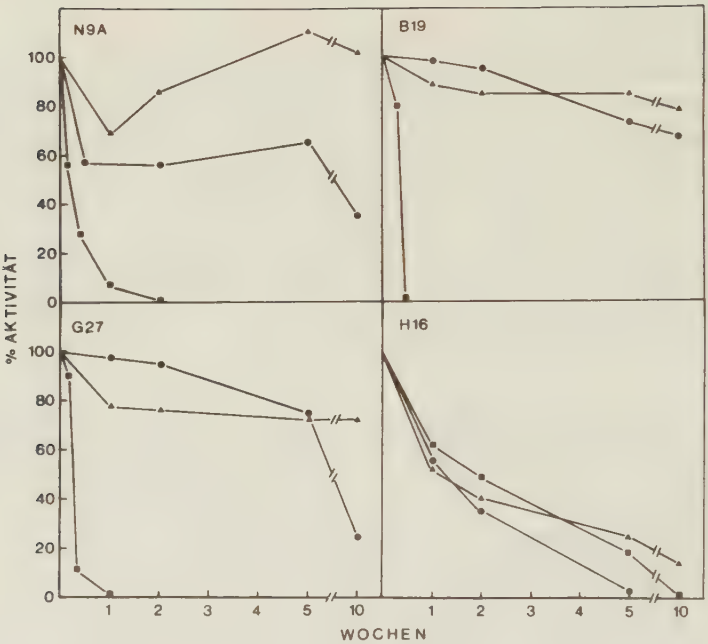


Abb. 9: Stabilitätsverhalten der löslichen Hydrogenasen

Für die Stabilitätsversuche wurden die löslichen Fraktionen (100 000 g-Überstände) der Rohextrakte verwendet. Die Extrakt-Lösungen wurden in gleiche Portionen aufgeteilt und unter verschiedenen Bedingungen aufbewahrt. Die Aktivitätsveränderungen wurden über einen Zeitraum von 10 Wochen verfolgt.

- ● Aufbewahrung bei 4°C unter H_2
- ▲ Aufbewahrung bei -20°C unter H_2
- ■ Aufbewahrung bei 4°C unter Luft

Betrachtet man die Stabilitätsdiagramme der Abbildung 9, so fällt bei den Stämmen B19, G27 und N9A die Diskrepanz zwischen schneller Inaktivierung der Hydrogenasen unter Luft und die relative Aktivitätskonstanz der H_2-stabilisierten Enzyme auf, während bei H16 in jedem Fall, ob unter Luft oder unter H_2, weder ein krasser Aktivitätsabfall, noch Aktivitätskonstanz, sondern eine kontinuierliche Aktivitätsabnahme zu beobachten ist, bedingt durch Sauerstoffunempfindlichkeit einerseits und der fehlenden stabilisierenden Wirkung von H_2 andererseits.
Zehnmaliges Einfrieren und Auftauen der Extrakte führte bei allen Stämmen zu einem Aktivitätsverlust, der zwischen 10 und 15% liegt.

3. Aktivität und Stabilität der partikelgebundenen Hydrogenasen

Die partikulären Hydrogenasen der vier Stämme waren sich hinsichtlich der untersuchten Eigenschaften sehr ähnlich. Ihre Aktivität (MB-Reduktion) in der Partikelfraktion des Rohextrakts lag etwa zwischen 1900 und 2500 µl H_2-Aufnahme/Std·mg Protein (vgl. Tabelle 3).
Das Stabilitätsverhalten ähnelte sehr dem der partikulären Hydrogenasen der anderen, unter I. beschriebenen Stämme (vgl. Abbildung 7). Die Sauerstoffempfindlichkeit der Enzyme war geringer, die Stabilität in einer H_2-Atmosphäre noch ausgeprägter als bei den löslichen Hydrogenasen. Während die löslichen Enzyme im eingefrorenen Zustand am stabilsten waren, war die Stabilität der partikulären Hydrogenasen unter diesen Bedingungen geringer als bei einer Temperatur von 4°C. In Zahlen drücken sich die Aktivitätsverluste nach 10wöchiger Aufbewahrung der Partikelsuspensionen wie folgt aus: unter H_2 bei 4°C: 0-15%; unter Luft bei 4°C: 80-90%; unter H_2, eingefroren: 40-50%.
Der Aktivitätsverlust nach zehnmaligem Einfrieren und Auftauen belief sich auf 20-25%.

B. Stabilisierung, Reinigung und Charakterisierung der löslichen Hydrogenase von A.eutrophus H16

1. Stabilisierung der Hydrogenase

Die lösliche Hydrogenase von H16 erwies sich im zellfreien Extrakt trotz weitgehender O_2-Unempfindlichkeit und Unabhängigkeit von einer H_2-Atmosphäre als sehr instabil. Diese Instabilität drückte sich nicht nur in steter Aktivitätsabnahme des Enzyms während der Aufbewahrung aus (vgl. Abbildung 9), sondern auch in der je nach Extrakt und vorausgegangener Zellanzucht unterschiedlichen Geschwindigkeit der Aktivitätsabnahme. So verloren die aus Fermenter-Zellen gewonnenen Extrakte häufig ihre gesamte Hydrogenaseaktivität schon innerhalb der ersten 1-2 Wochen. Da nach den Befunden von PFITZNER et al. (1970) die Hydrogenase auch im teilweise angereicherten Zustand innerhalb von 10 Tagen 30% Aktivität verlor, wurden zunächst umfangreiche Stabilitätsversuche angestellt, um so eventuell existierende Stabilisatoren ausfindig zu machen, stabilitätsvermindernde Faktoren auszuschalten und um das Stabilitätsverhalten insgesamt analysieren zu können.

1.1. Ermittlung optimaler Zellaufschlußbedingungen

Ziel dieser Versuche war, einerseits eine möglichst milde Aufschlußmethode zu finden, um eine Schädigung und eine teilweise Inaktivierung des Enzyms zu vermeiden, andererseits sollte ein effektiver Aufschluß mit hoher Protein- und Hydrogenauseausbeute erreicht werden.
Zunächst wurde die Aufschlußeffektivität durch US in Abhängigkeit von der Beschalldauer geprüft. Maximale Gesamtaktivität bei einer Leistung von 40% der Gesamtkapazität des US-Geräts (Fa. Schoeller) wurde schon nach 10 sec US-Behandlung pro ml Zellsuspension erreicht (Abbildung 10). Längere Einwirkung von

US führte zu allmählicher Enzyminaktivierung. Nach 30 sec/ml betrug der Aktivitätsverlust trotz noch leicht ansteigender Proteinfreisetzung (vgl. Abbildung 10) 25%. Kurze US-Einwirkung auf die Zellen erwies sich auch im Vergleich mit anderen Aufschlußmethoden als am wirkungsvollsten und vorteilhaftesten, zumal sich herausstellte, daß die Methode des Aufschlusses keinen Einfluß auf die Stabilität der Hydrogenase hatte. Extrakte, die durch FP-Aufschluß oder nach Lysozymbehandlung erhalten wurden, erreichten zwar ähnlich hohe spezifische, aber niedrigere Gesamtaktivitäten.

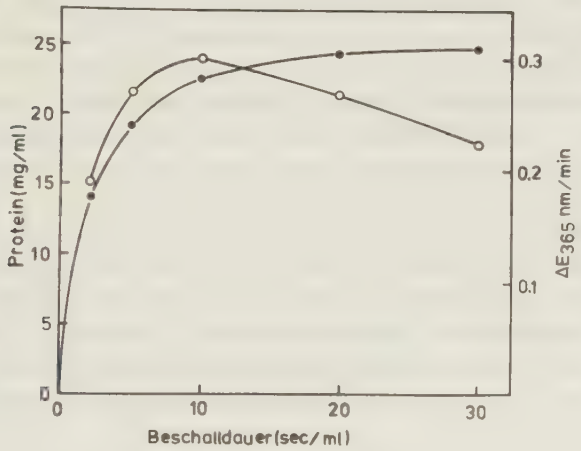


Abb. 10: Abhängigkeit der Zellaufschlußeffektivität von der Ultraschalleinwirkungsdauer

Je 15 ml Zellsuspension wurden mit einem Schoeller-Ultraschallgerät unterschiedlich lange (2-30 sec/ml) beschallt. Die Leistung des Geräts (40% der Gesamtkapazität) wurde während der Beschallung konstant gehalten. Nach Abzentrifugation der Zelltrümmer (20 min bei 10 000 g) wurden die Aktivität der Hydrogenase und der Proteingehalt des Rohextrakts bestimmt.

○ Hydrogenaseaktivität; ● Proteingehalt

1.2. Aktivität und Stabilität der Hydrogenase nach Gelfiltration des Rohextrakts auf Sephadex G-25

Mit dem Ziel, niedermolekulare Substanzen von proteinhaltigen Fraktionen abzutrennen, um so ein eventuell vorhandenes Cofaktorbedürfnis oder Veränderungen im Stabilitätsverhalten des Enzyms feststellen zu können, wurde der Rohextrakt an einer Sephadex G-25-Säule (1,5 x 30 cm; Füllhöhe 20 cm) gelfiltriert.
Die Hydrogenaseaktivität nahm nach dem Säulenlauf nicht ab, sondern erfuhr sogar eine 12%ige Steigerung. Der Zusatz von hydrogenasefreien Fraktionen des Säulennachlaufs brachte keine Stimulierung der Aktivität, im Gegenteil, korrespondierend mit der im chromatographierten Extrakt gemessenen 12%igen Aktivitätssteigerung, hatten einige Fraktionen des Säulennachlaufs eine leichte aktivitätsvermindernde Wirkung. Der Zusatz eines hitzebehandelten (5 min Inkubation bei 70°C), enzymatisch inaktiven Rohextrakts hatte keinerlei Einfluß auf die Hydrogenaseaktivität des cofaktorfreien Extrakts.
Diese Ergebnisse zeigen an, daß die Hydrogenase keine für die Enzymkatalyse essentiellen Cofaktoren, zumindest keine dissoziablen oder sich locker an das Enzym bindende Cofaktoren benötigt. Diese Aussage wurde auch bestätigt durch die geringe Wirkung einzeln zugesetzter Cofaktoren und Metallionen, deren Einfluß auf das gereinigte Enzym im Kapitel 3.7. ausführlich behandelt wird.
Die Behandlung des Extrakts mit Sephadex G-25 vermochte die Hydrogenase noch nicht ausreichend zu stabilisieren, sie erhöhte aber die Stabilität immerhin um fast das Doppelte. Das läßt darauf schließen, daß der Rohextrakt niedermolekulare Begleitstoffe enthält, die nicht nur hemmenden Einfluß auf die Enzymaktivität haben, sondern auch zumindest teilweise für die Instabilität der Hydrogenase verantwortlich sind.

1.3. Abhängigkeit der Stabilität von pH-Wert und Puffersystem

Um von vornherein schwer ausmachbare Extrakteinflüsse auszuschließen, wurden die folgenden Untersuchungen an Enzymlösungen durchgeführt, die durch CTAB-Fällung, Ammoniumsulfatfraktionierung und Dialyse bereits von Nucleinsäuren, Salzen, anderen niedermolekularen Verbindungen und auch vom größten Teil des Proteins befreit war.
Die lösliche Hydrogenase besaß kein ausgesprochenes pH-Stabilitätsoptimum, sondern erwies sich im teilweise angereicherten Zustand über einen weiten pH-Bereich als stabil. Selbst bei alkalischen Werten um 9 war der Aktivitätsverlust nach 3 Wochen Aufbewahrung bei $4^{o}C$ kaum größer als im neutralen Bereich, wo er ca. 25% betrug. Deutlich abnehmende Stabilität war dagegen im sauren Milieu zu beobachten, wenn sich der pH dem Isoelektrischen Punkt (IEP) der Hydrogenase (4,85) näherte. Über die Bestimmung des IEP wird in Kapitel 3.13. ausführlich berichtet.
Als geeignete Puffer wurden KH_2PO_4-Puffer (0,05 M; pH 7,0) und Tris-HCl-Puffer (0,1 M; pH 7,5) ermittelt. Schnell an Aktivität verlor die Hydrogenase in Citrat-Puffer. Ein stark hemmender Einfluß wurde durch den neben Kalium auch Natrium enthaltenden Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (1909) ausgeübt (vgl. dazu die Kapitel 3.3. und 3.5.).

1.4. Einfluß potentiell stabilisierender Verbindungen

Die Stabilisierung, die allein durch Gelfiltration oder Dialyse, durch teilweise Anreicherung, geeigneten pH-Wert und Puffer erreicht wurde, ließ einen geringen Einfluß möglicher stabilisierender Effektoren erwarten. Die Ergebnisse entsprachen dieser Erwartung. Lediglich katalytische Mengen Eisen und Mangan wiesen einen, wenngleich wenig signifikanten, stabilisierenden Effekt auf. EDTA verminderte die Stabilität des Enzyms

erheblich. Eine 1 mM Konzentration führte schon innerhalb einer Woche zu völligem Aktivitätsverlust. NAD hatte keinen Einfluß.

1.5. Stabilitätsverhalten des oxidierten und reduzierten Enzyms

Eine Überraschung war die Beobachtung, daß die teilweise angereicherte, ebenso wie die hochgereinigte Hydrogenase bei Aufbewahrung (4°C) unter molekularem Wasserstoff eine dreimal so hohe Aktivitätsverlustrate aufwies wie eine unter Luft aufbewahrte Enzymlösung (Tabelle 4). In Gegenwart katalytischer Mengen (5 µM) NADH wurde diese durch H_2 bedingte Instabilität des Enzyms noch extrem gesteigert: Die Hydrogenase verlor unter diesen Bedingungen schon innerhalb weniger Tage ihre gesamte Aktivität. NADH in dieser Konzentration allein zugesetzt hatte nur geringen Einfluß.
Die ungewöhnliche Wirkungsweise des molekularen Wasserstoffs war Anlaß zu prüfen, ob der destabilisierende Einfluß allein durch H_2 oder generell durch reduzierende Bedingungen ausgeübt wird. Letzteres wurde durch die in Tabelle 4 zusammengestellten Daten bestätigt. Reduktionsmittel wie Glutathion, Mercaptoäthanol oder Dithionit, selbst in geringen Konzentrationen (25µM) zugesetzt, inaktivierten die Hydrogenase innerhalb weniger Tage fast völlig. Die gleiche Wirkung ging von höheren Konzentrationen (1 mM) NADH aus.
Diese extreme Instabilität des reduzierten Enzyms ließ sich nicht nur durch sich über Tage erstreckende Aufbewahrungsversuche demonstrieren: Wurde das oxidierte Enzym in der Küvette (im 1:600 verdünnten Zustand) 20 min bei 30°C vorinkubiert, so war das mit keinerlei Aktivitätsverlusten verbunden. Das reduzierte Enzym dagegen verlor unter denselben Bedingungen schon nach 5 min fast zwei Drittel seiner Aktivität und nach 20 min war nur noch eine Restaktivität registrierbar.
Sollte die NAD-Reduktion im Warburg-Versuch verfolgt werden, und der Hauptraum des Warburggefäßes enthielt katalytische Mengen NADH, so konnte nach der Begasungsprozedur (15 min bei 30°C un-

Tab. 4: Einfluß reduzierender Bedingungen auf die Stabilität der Hydrogenase

Reduzierendes Agenz	Konzentration (mM)	Atmosphäre	% Aktivitätsverlust nach 5 Tagen	% Aktivitätsverlust nach 3 Wochen
ohne Zusatz	-	Luft	0	25
H_2	gesättigt	H_2	15	75
H_2 + 5 µM NADH	gesättigt	H_2	100	100
NADH	0,025	Luft	10	50
NADH	1	Luft	95	100
Glutathion	0,025	N_2	89	100
Dithionit	1	N_2	96	100
Mercaptoäthanol	1	N_2	97	100
Mercaptoäthanol	10	N_2	100	100
Mercaptoäthanol	10	Luft	25	90

Je 0,5 ml einer Enzymlösung, die den jeweiligen in der Tabelle angegebenen Zusatz enthielt und gegebenenfalls mit H_2 oder N_2 begast worden war, wurden bei 4°C aufbewahrt und nach 5 Tagen und 3 Wochen auf ihre veränderte Aktivität hin geprüft.

ter Schütteln) und dem Kippen der NAD-Lösung in den Hauptraum keinerlei Wasserstoffaufnahme gemessen werden.

Auf der Basis dieser Untersuchungsergebnisse läßt sich auch die Instabilität der Hydrogenase im Rohextrakt erklären. Sie rührt offensichtlich daher, daß das Enzym im Rohextrakt noch "teilreduziert"* vorliegt, d.h. daß es noch geringe Mengen Wasserstoff und NADH gebunden hält. Folgende Beobachtungen belegten die Richtigkeit dieser Annahme: 1. Die Anlaufphase der NAD-Reduktion war beim Rohextrakt-Enzym um über die Hälfte kürzer als beim reinen Enzym. 2. Die Substratsättigungen des Rohextrakt-Enzyms glichen denen des "teilreduzierten" reinen Enzyms. 3. Andere H-Acceptoren als NAD wurden vom reinen Enzym nur in Gegenwart von NADH oder Verbindungen ähnlich aktivierender Wirkung reduziert. Das Rohextrakt-Enzym war auf Zusätze aktivierender Agenzien nicht angewiesen. 4. FMN steigerte die Aktivität des Rohextrakt-Enzyms um 25%. Am reinen Enzym konnte nachgewiesen werden, daß FMN allein auf die reduzierte oder "teilreduzierte" Hydrogenase eine aktivierende Wirkung ausübt.

Die Instabilität des teilweise gereinigten Enzyms, von der PFITZNER et al. (1970) berichteten (30% Aktivitätsverlust nach 10 Tagen bei -16 °C), beruhte wahrscheinlich auf dem inaktivierenden Einfluß von H_2. In der Annahme, molekularer Wasserstoff würde eine stabilisierende Funktion erfüllen, war die Hydrogenase vor dem Einfrieren unter H_2-Druck von der TEAE-Säule eluiert und in H_2-gesättigtem Puffer anaerob dialysiert worden.

---

* Als "teilreduziert" wird dasjenige Enzym bezeichnet, dessen Reaktionsanlaufphase durch den Einfluß reduzierender Bedingungen verkürzt, aber noch nicht aufgehoben ist. Als "reduziert" soll dasjenige Enzym verstanden werden, dessen Reaktionsgeschwindigkeit von Anfang an maximal ist. Da der exakte jeweilige Grad der Reduktion und der vorliegende Gleichgewichtszustand zwischen oxidiertem und reduziertem Enzym nicht zu erfassen und zu kennzeichnen ist, soll an diesen Begriffen trotz ihrer Unzulänglichkeit auf der Grundlage der hier formulierten Definition festgehalten werden.

Das in diesem Kapitel beschriebene Phänomen, die durch H_2 und Reduktionsmittel hervorgerufene Instabilität der Hydrogenase von H16, steht in völligem Gegensatz zu der O_2-Empfindlichkeit und dem Stabilitätsverhalten anderer Hydrogenasen, die in den meisten Fällen auf Reduktionsmittel oder zumindest auf molekularen Wasserstoff als Stabilisator angewiesen sind. Die Enzyme im einzelnen zu vergleichen, die von reduzierenden Verbindungen ausgehenden Wirkungen voneinander zu differenzieren und ihre Bedeutung für die Hydrogenase zu erörtern soll u.a. Gegenstand der "Diskussion" sein.

1.6. Stabilitätsoptimum der gereinigten Hydrogenase

Wurde die gereinigte Hydrogenase, gelöst in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit neutralem pH-Wert, im oxidierten Zustand und unter Zusatz von 5-25 µM $MnCl_2$ bei -20°C aufbewahrt, so war sie stabil und verlor innerhalb eines halben Jahres keinerlei Aktivität. Die bei 4°C zu beobachtende, allmähliche Aktivitätsabnahme wurde aufgehalten durch die Beifügung von 1,5 M Ammoniumsulfat. Unter diesen Bedingungen verlor das Enzym auch bei 4°C mindestens in dem Zeitraum von 3 Monaten keine Aktivität. Saccharose und Glycerin dagegen wirkten enzyminaktivierend.

2. Reinigung der Hydrogenase

Untersuchungen zur Charakterisierung H_2-verwertender Hydrogenasen aerober Knallgasbakterien beschränkten sich bisher weitgehend auf zellfreie Extrakte. Teilweise angereichert wurden die löslichen Hydrogenasen von Pseudomonas ruhlandii (BONE, 1963), Alcaligenes eutrophus H16 (PFITZNER et al., 1970) und Nocardia opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1974). Die Reindarstellung einer Hydrogenase gelang bisher nicht. Es war deshalb eine vorrangige Aufgabe dieser Arbeit, ein Anreicherungsverfahren

zu erarbeiten, das die Gewinnung eines homogenen Enzympräparates ermöglichte, um so die Begrenztheit bisheriger Untersuchungen und Aussagen zu durchbrechen, und auch, um zu einem konkreten Vergleich mit den bereits dargestellten und eingehend charakterisierten H_2-produzierenden Hydrogenasen von Clostridium pasteurianum W5 (NAKOS und MORTENSON, 1971a; CHEN und MORTENSEN, 1974) und Desulfovibrio vulgaris (HASCHKE und CAMPBELL, 1971; LEGALL et al., 1971) zu kommen.

2.1. CTAB-Fällung und Ammoniumsulfatfraktionierung

Zur Entfernung von Nucleinsäuren und in geringerem Maße von Protein wurde dem zellfreien löslichen Extrakt eine 2,5%ige CTAB-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,15% tropfenweise zugesetzt. Die Fällung führte, ohne mit Aktivitätsverlusten verbunden gewesen zu sein, zu einer 1,4fachen Anreicherung (vgl. die zusammenfassenden Daten aller Reinigungsschritte in Tabelle 5). Durch Erhöhung der CTAB-Endkonzentration konnte die spezifische Hydrogenaseaktivität zwar noch geringfügig gesteigert werden, die in Relation dazu stehende starke Verringerung der Enzymausbeute von über 20% war jedoch nicht tragbar.

Der geringere Teil (25%) der Hydrogenase wurde durch Ammoniumsulfat im Sättigungsbereich zwischen 40 und 50%, die Hauptmasse des Enzyms zwischen 50 und 60% gefällt. Die Unempfindlichkeit und Stabilität der Hydrogenase gegenüber Ammoniumsulfat erlaubte, zwei Fraktionierungsschnitte (0-40% und 40-60% - Sättigung) durchzuführen. Das in KP-Puffer (20 mM; pH 7,0) gelöste Präzipitat der zweiten Fällung wies vor der Dialyse 75%, und nach der Dialyse eine sogar über die Gesamtaktivität des Rohextrakts hinausgehende Ausbeute von 105% auf. Diese Aktivitätssteigerung beruhte zum einen auf der Reversibilität der durch hohe Salzkonzentration hervorgerufenen Aktivitätshemmung (vgl. Kapitel 3.6.) und zum anderen auch auf der Entfernung nieder-

molekularer und aktivitätsvermindernder Begleitstoffe des Rohextrakts, deren Anwesenheit und Einfluß bereits in Kapitel 1.2. beschrieben wurde.

2.2. DEAE-Cellulose-Säulenchromatographie

Da die Hydrogenase ein saures Protein ist mit einem IEP von 4,85, empfahl und erwies sich die Chromatographie an DEAE-Cellulose als effektiv. Die Trennkapazität dieses Anionenaustauschers einerseits und die Stabilität der Hydrogenase in einem weiten pH-Bereich andererseits wurden dazu ausgenutzt, dem ersten DEAE-Cellulose-Schritt unter veränderten Bedingungen einen zweiten folgen zu lassen. Die erste Säule wurde mit 20 mM KP-Puffer (pH 7,0), die zweite mit 50 mM Tris-HCl (pH 8,2) äquilibriert. Die Elution erfolgte jeweils mittels eines linearen KCl-Gradienten (0-0,5 M KCl).
Die Chromatographie bei pH 7,0 führte zu einem Gesamtanreicherungsfaktor von 14 (Tabelle 5). Die Hydrogenase wurde bei einer KCl-Konzentration von 0,32 M eluiert. Das Elutionsdiagramm ist in Abbildung 11 dargestellt. Neben Hydrogenasepeak und Proteinprofil demonstrierte es auch die Identität der Aktivitätsmaxima von Hydrogenase und Diaphorase, auf die in Kapitel 3.9.3. näher eingegangen wird.
Bei pH 8,2 war die Adsorption der Hydrogenase an DEAE-Cellulose weniger stark. Der KCl-Gehalt am Aktivitätsmaximum betrug hier 0,18 M. Gegenüber der spezifischen Aktivität des ersten DEAE-Cellulose Extrakts konnte unter diesen Bedingungen noch einmal eine fast zweifache Anreicherung erzielt werden.

2.3. Sephadex G-200-Gelfiltration

Nach den zuerst durchgeführten Anreicherungen, die eine Gelfiltration in einer Sephadex G-200-Säule (2,5 x 45 cm) einschlos-

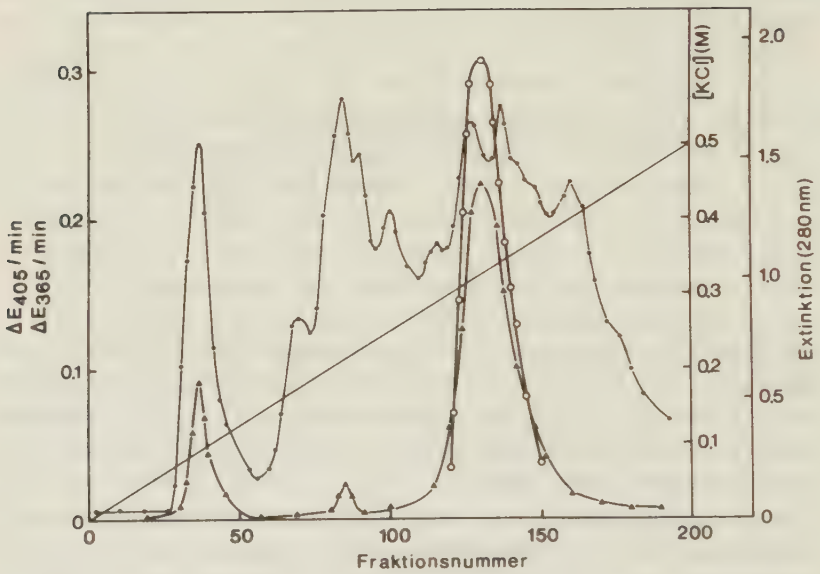


Abb. 11: Chromatographie an DEAE-Cellulose bei pH 7,0

Die Trennung erfolgte an einer mit 20 mM KP-Puffer (pH 7,0) äquilibrierten DEAE-Cellulose-Säule (2,5 x 45 cm; Füllhöhe 40 cm). Die Proteinlösung wurde über einen Flow-Adapter auf die Geloberfläche aufgetragen und mit einem KCl-Gradienten (0-0,5 M KCl) eluiert. Das Elutionsvolumen der einzelnen Fraktionen betrug 3 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 18-20 ml/Std.

- ● Protein (UV-Absorption bei 280 nm)
- ○ Hydrogenase (ΔE_{365}/min)
- ▲ Diaphorase (ΔE_{405}/min)
- — KCl-Konzentration (M)

sen, fiel bei den gelelektrophoretischen Analysen eine verunreinigende Proteinbande auf, die auch durch Hydroxylapatit nicht abzutrennen war.
Die Molekulargewichtsbestimmung durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach HEDRICK und SMITH (1968) beruht auf der Proportionalität zwischen dem Logarithmus der relativen Wanderungsgeschwindigkeit eines Proteins und der Gelkonzentration. Mit Hilfe dieser Methode konnte das hohe Molekulargewicht des verunreinigenden Proteins von ca. 350 000 ermittelt und damit der wichtige Hinweis gegeben werden, daß eine Effektivierung der Gelfiltrationsbedingungen die Trennung der Hydrogenase von der fremden Proteinkomponente bewirken müßte.
Es wurden daher zwei Chromatographierohre hintereinandergeschaltet, die am unteren Ende durch einen kurzen Kapillarschlauch miteinander verbunden waren. In der ersten Säule wurde absteigend, in der zweiten aufsteigend chromatographiert. Eluiert wurde das Protein mit 50 mM KP-Puffer (pH 7,0),dem gleichen Puffer, mit dem das Gelbett vor Versuchsbeginn äquilibriert worden war.
Die Anwendung dieser Bedingungen führte zur erfolgreichen Eliminierung der verunreinigenden Komponente. Das Elutionsdiagramm (Abbildung 12) zeigte, daß bereits nach diesem Reinigungsschritt die Hydrogenase auch im Proteinprofil schon als deutlicher peak hervortrat.

2.4. Chromatographie an Hydroxylapatit

An die Gelfiltration schloß sich die Hydroxylapatit-Säulenchromatographie als letzter Schritt innerhalb der Enzymreinigung an. Das Hydroxylapatit (HAP) wurde mit 10 mM KP-Puffer (pH 7,0) äquilibriert und das Protein nach dem Auftragen über einen Flow-Adapter mit einem linearen Gradienten desselben Puffers (10-300 mM) eluiert.
Auch nach dieser Proteinfraktionierung wiesen Hydrogenase und

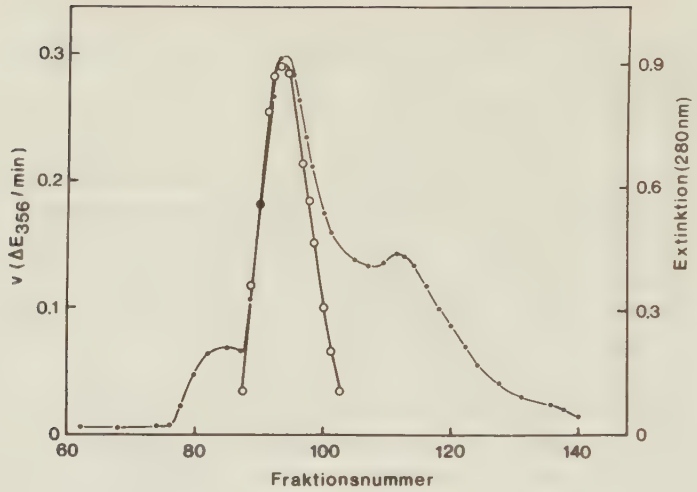


Abb. 12: Diagramm des Sephadex G-200-Eluats

Die Gelfiltration erfolgte an zwei miteinander gekoppelten, mit 50 mM KP-Puffer (pH 7,0) äquilibrierten Sephadex G-200-Säulen (je 2,5 x 45 cm; Füllvolumen insgesamt 350 ml). Die auf 1,5 ml eingeengte Proteinlösung wurde zwischen Geloberfläche und Puffer-Überstand geschichtet. Das Elutionsvolumen der gesammelten Fraktionen betrug 2 ml, die Durchflußgeschwindigkeit 12 ml/Std.

● Protein (UV-Absorption bei 280 nm);

○ Hydrogenase (ΔE_{365}/min)

Diaphorase ein analoges Aktivitätsdiagramm auf, deren höchste katalytische Wirksamkeit in Fraktion 34 erschien (Abbildung 13). Die Kaliumphosphatkonzentration dieser Fraktion betrug 100 mM. Die Chromatographie an HAP brachte zwar keinen großen Anreicherungseffekt mehr, trennte aber noch einige verunreinigende und in geringer Konzentration vorliegende Proteine ab. Bei einer Ausbeute von 20% und einem Gesamtanreicherungsfaktor von 68

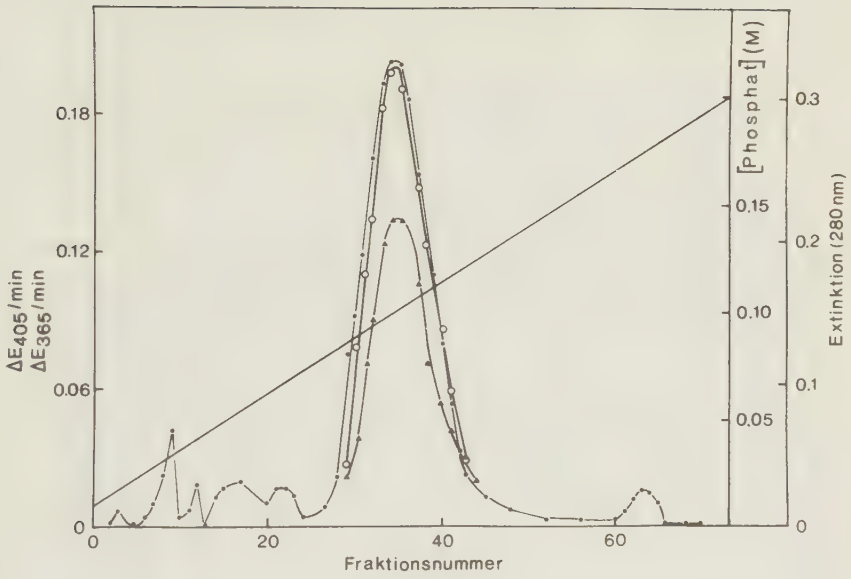


Abb. 13: Diagramm des Hydroxylapatit-Eluats

Die Trennung erfolgte an einer mit 10 mM KP-Puffer (pH 7,0) äquilibrierten Hydroxylapatit-Säule (1,6 x 30 cm). Das Protein wurde mit Hilfe eines linearen Kaliumphosphat-Gradienten (10-300 mM) eluiert. Das Elutionsvolumen betrug 2 ml/Fraktion, die Durchfluß-geschwindigkeit 12 ml/Std.

- ● Protein (UV-Absorption bei 280 nm)
- ○ Hydrogenase (ΔE_{365}/min)
- ▲ Diaphorase (ΔE_{405}/min)
- — Kaliumphosphat-Konzentration (M)

Tab. 5: Reinigung der löslichen Hydrogenase von A. eutrophus H16

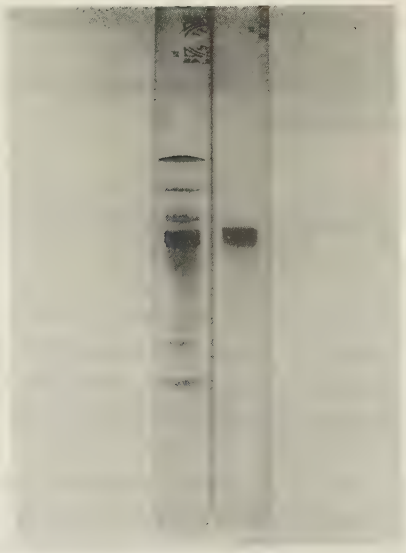
Reinigungsschritt	Volumen (ml)	Gesamtprotein (mg)	Gesamtaktivität (E)	spezifische Aktivität (E/g Protein)	Anreicherungsfaktor	Ausbeute (%)
1.zellfreier Extrakt	150	3.410	2.730	800	1,0	100
2.CTAB-Fällung	148	2.410	2.700	1.120	1,4	99
3.Ammoniumsulfat-Fraktionierung	22	1.050	2.860	2.720	3,4	105
4.DEAE-Cellulose (20 mM KP-Puffer, pH 7,0)	69	158	1.770	11.200	14	65
5.DEAE-Cellulose (50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 8,2)	36	74	1.530	20.680	26	56
6.Sephadex G-200	17	18,5	765	41.350	52	28
7.Hydroxylapatit	7	10,1	550	54.460	68	20

Die Hydrogenaseaktivität wurde photometrisch bei 365 nm als NAD-Reduktion gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von LOWRY et al. (1951). Die Versuchsbedingungen der einzelnen Anreicherungsschritte sind den "Methoden" und den Legenden entsprechender Abbildungen (11-13) zu entnehmen.

erreichte die Hydrogenase eine spezifische Aktivität von 54 460 E/g Protein (Tabelle 5).
Die so gereinigte Enzymlösung war je nach Verdünnungsgrad gelblich bis gelb-braun gefärbt.

2.5. Gelelektrophoretische Reinheitsanalyse der angereicherten Hydrogenase

Die Sauberkeit des Enzyms wurde bereits im Elutionsdiagramm des HAP-Extrakts (Abbildung 13) durch die Identität von Protein- und Aktivitätsprofil eindrucksvoll dokumentiert, sie sollte aber mit Hilfe der Polyacrylamid-Disk-Elektrophorese exakter analysiert werden.
Wurden die innerhalb des Hydrogenase-Protein-peaks liegenden Fraktionen (29-41) oder aliquots dieser Fraktionen vereinigt, so traten nach elektrophoretischer Auftrennung neben einer starken Hauptbande zwei ganz feine, schmale Banden in Erscheinung, die nur im teilweise entfärbten Gel oder nach Überladung des Gels mit Protein sichtbar waren.
Wurden aus den hydrogenaseaktiven Fraktionen getrennt voneinander drei Pools gebildet (Pool I: Fraktionen 29-32; Pool II: 33-36; Pool III: 37-41) und elektrophoretisch untersucht, so erwies sich die Enzymlösung von Pool I als frei von Verunreinigungen (Abbildung 14B). Die mit Comassie Blue angefärbte Proteinbande, die mit der Hydrogenaseaktivitätsbande identisch war (vgl. die im folgenden Kapitel behandelten Nachweisversuche), ließ sich nicht in weitere Banden auftrennen, auch nicht durch Verstärkung des Siebeffekts im Gel (Erhöhung der Gelkonzentration von 7,5 auf 10 und 12,5%). Dies wurde mit verschiedenen Gelsystemen (nach MAURER, 1968 und HEDRICK und SMITH, 1968; Zusammensetzung der Gele, siehe "Methoden") nachgewiesen. Das durch Verunreinigung der Fraktionen 29-32 des HAP-Eluats gewonnene Hydrogenasepräparat kann somit als elektrophoretisch homogen bezeichnet werden. Die Abtrennung der beiden letzten verun-



A B

Abb. 14: Analytische Disk-Elektrophorese verschiedener Reinigungsstufen der Hydrogenase

Jeweils 50 µg Protein wurden auf das Standardgel (nach dem System A nach MAURER, 1968) aufgetragen. Die Gelkonzentration betrug 10%. Pro Gelröhrchen wurde eine Stromstärke von 3 mA angelegt. Nach einer Laufzeit von 5 Std wurden die Proteinbanden mit einer Coomassie Blue-Lösung nach WEBER und OSBORN (1969) angefärbt.

A: Sephadex G-200-Extrakt

B: Reines Hydrogenasepräparat (Hydroxylapatit-Eluat, Pool I)

reinigenden Proteinkomponenten hatte auf Anreicherungsfaktor und spezifische Aktivität keinen Einfluß mehr. Dies, ebenso wie die geringe Wahrnehmbarkeit der Nebenbanden im Gel, das Fehlen einer erkennbaren Proteinabsorption bei 280 nm und

schließlich der bemerkenswerte Befund, daß die aktivsten Fraktionen (33-36) sich nicht auch als die reinsten erwiesen, sprechen dafür, daß die Verunreinigungen in den entsprechenden Fraktionen des HAP-Extrakts nur in Spuren und bedeutungslos gering konzentriert vorlagen.
Prinzipiell ließen sich auch die noch schwach verunreinigten Fraktionen in einem zweiten HAP-Säulenlauf durch "Ausverdünnung" der Begleitproteine vollständig reinigen. Da aber die dabei auftretenden Aktivitätsverluste zu Lasten der Ausbeute und auch der spezifischen Aktivität gehen würden, sollte eher versucht werden, durch Veränderungen der Chromatographiebedingungen (die Erhöhung des pH-Wertes und die Verflachung des Gradienten bieten sich an) eine noch schärfere Trennung zwischen Hydrogenase und Begleitprotein zu erreichen.

2.6. Nachweis von Hydrogenaseaktivitätsbanden im Polyacrylamidgel

Die einzelne im Polyacrylamid nachgewiesene Proteinbande konnte mit Hilfe von Aktivitätsfärbungen in parallel gelaufenen Gelduplikaten eindeutig als Hydrogenasebande identifiziert werden. Als Aktivitätsnachweis gelang sowohl die gekoppelte Reduktion von Nitroblau-Tetrazolium in Gegenwart von NAD und PMS (die Enzymbande färbte sich blau-violett), als auch die nach dem Verfahren von ACKRELL et al. (1966) modifizierte Methylviologen-Reduktion (Ausbildung eines intensiv blauen Rings).

Aufsehen erregte 1966 die Arbeit von ACKRELL et al., in der multiple Formen von Hydrogenasen im Rohextrakt verschiedener Organismen nachgewiesen wurden. Man führte das Auftreten mehrerer Aktivitätsbanden unterschiedlicher R_f-Werte auf die Gegenwart von Isoenzymen zurück.
NAKOS und MORTENSON (1971b) konnten aber bei Clostridium pa-

steurianum die multiplen Hydrogenaseformen als Artefakte entlarven. Bedingt durch Proteininteraktionen bildete die Hydrogenase im Rohextrakt mit anderen Enzymen Assoziationen, die verschiedene elektrophoretische Mobilität aufwiesen. Im Zuge der Reinigung der Hydrogenase verschwand auch die Vielzahl der Aktivitätsbanden wieder.
Es war nun von Interesse zu ergründen, ob ähnliche Erscheinungen auch bei H16 zu beobachten sind. In der Tat waren nach der Elektrophorese des Rohextrakts (lösliche Fraktion) von H16 auch mehrere, insgesamt 3 Aktivitätsbanden nachzuweisen (Abbildung 15A), aber schon nach der Ammoniumsulfatfraktionierung war, ebenso wie nach allen folgenden Anreicherungsschritten, nur noch eine Aktivitätsbande identifizierbar, die schon nach der Elektrophorese des Rohextrakts als Hauptbande erschienen war. Diese Resultate bestätigten auch für H16 die von NAKOS und MORTENSON schon für C.pasteurianum getroffene Aussage, daß keine Isoenzyme existieren.

3. Charakterisierung der gereinigten Hydrogenase

Für die Untersuchungen zur Charakterisierung der Hydrogenase wurde das aus dem letzten Reinigungsschritt gewonnene, ca. 70fach angereicherte Enzym verwendet. Für den Nachweis der Diaphoraseaktivität, die Messungen der Absorptions- und Fluoreszenzspektren und die Versuche zur Untereinheitenbestimmung, für Untersuchungen also, die ein absolut reines Enzym erfordern, wurden die als homogen charakterisierten Fraktionen (29-32) des HAP-Eluats eingesetzt.

3.1. Zeitlicher Reaktionsverlauf der NAD-Reduktion

Die Kinetik der NAD-Reduktion war gekennzeichnet durch eine Anlaufphase, die je nach Reaktionsbedingungen unterschiedlich

Abb. 15: Aktivitätsbanden der löslichen Hydrogenase von H16 im Polyacrylamidgel: Vergleichende Elektrophorese des Rohextrakts (A) und des angereicherten Enzyms (B)

Jeweils 50 µg Protein wurden auf die Geloberfläche (System A) aufgetragen. Um die rasche Diffusion des während der Aktivitätsfärbung entstehenden Reaktionsprodukts und damit die Verschmierung der Banden zu vermeiden, wurden 12,5%ige Gele verwendet. Die Laufzeit der Elektrophorese (Stromstärke: 3 mA/Röhrchen) wurde entsprechend geringerer Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins auf 8 Std erhöht. Die Aktivitätsfärbung der Hydrogenasebanden wurde in Reagenzröhrchen durchgeführt, die in 15 ml 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) 1 mM NAD, 0,06 mM Nitroblau-Tetrazolium und 0,1 mM PMS enthielten. Die Röhrchen wurden bei 30°C im Dunkeln inkubiert.

A: Rohextrakt (lösliche Fraktion)

B: HAP-Extrakt

ausgeprägt sein konnte, eine kurze 1-2minütige lineare Phase und durch die frühzeitige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

Wurde gereinigtes Enzym, H_2-gesättigter Tris-HCl-Puffer (50 mM; pH 8,0) und eine NAD-Konzentration von 0,6 mM eingesetzt, und wurde die Proteinkonzentration so eingestellt, daß im linearen Bereich die Extinktionszunahme bei 365 nm ca. 0,250 pro min betrug, so zeigte die lösliche Hydrogenase einen Reaktionsverlauf, wie er in Abbildung 16 dargestellt ist.
In den beiden folgenden Kapiteln soll die Anlaufphase und die frühzeitige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit charakterisiert und erklärt werden.

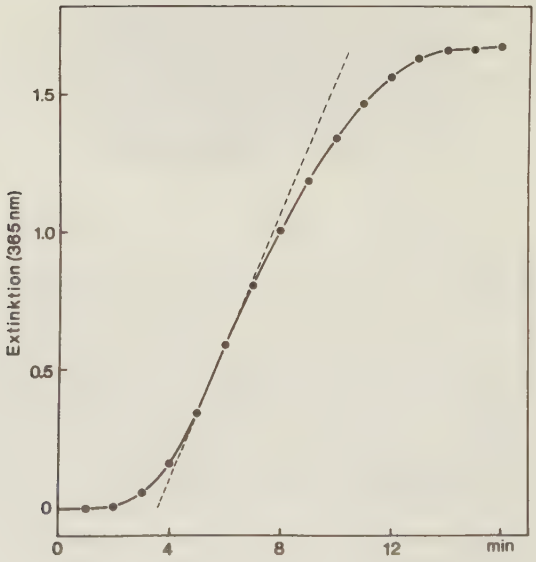


Abb. 16: Zeitlicher Verlauf der durch die gereinigte Hydrogenase katalysierten NAD-Reduktion

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; H_2-gesättigt); 0,6 mM NAD und 4,5 µg Protein. Inkubationstemperatur: 30°C.

3.1.1. Charakterisierung der Anlaufphase

Schon im Zusammenhang mit der Beschreibung des Stabilitätsverhaltens des Enzyms wurde die Inaktivität der Hydrogenase im oxidierten Zustand und ihr Übergang in die reaktionsfähige Enzymform kurz erläutert.
In diesem Kapitel soll nun der Versuch einer umfassenderen Charakterisierung der Reaktionsanlaufphase unternommen werden, basierend auf der Zusammenstellung der wichtigsten Einflüsse, die die Ausprägung der Anlaufphase, ihre Verkürzung, Aufhebung oder ihre Verlängerung bedingten.

1. Die Dauer der Anlaufphase war abhängig von der eingesetzten Enzymkonzentration. Die Erhöhung der Konzentration führte zu einer Verkürzung der Anlaufphase, ohne daß eine vollständige Aufhebung erreicht wurde. Die Dauer der Anlaufphase betrug nach Einsatz von 1,5 µg Protein 11 min, nach Einsatz von 4,5 µg ca. 5 min und in Gegenwart der fast zehnfachen Enzymmenge (40 µg) noch 1 min (Abbildung 17).
2. Entgegen den Angaben der Literatur (AHRENS und SCHLEGEL, 1966; PFITZNER et al., 1970) vermochte weder der alleinige Einfluß von H_2, noch der alleinige Einfluß katalytischer Konzentrationen NADH die Anlaufphase auszuschalten. 15 min Vorinkubation des Enzymproteins mit NADH oder H_2 veränderten die Reaktionskinetik ebensowenig oder unwesentlich wie eine mehrtägige Aufbewahrung bei $4^{\circ}C$ in Gegenwart dieser Verbindungen. Dieser Befund wurde eindeutig dadurch bestätigt, daß solche Vorbehandlungen weder zu einer sichtbaren Entfärbung, noch zu einem veränderten Absorptionsspektrum (siehe Kapitel 3.11.1.) der Hydrogenase führten, beides Merkmale, die sich neben dem Fehlen der Anlaufphase als weitere Kriterien für den reduzierten und aktivierten Zustand des Enzyms herausstellten.
   Wurde die Hydrogenase jedoch in Gegenwart beider Verbindungen, H_2 und NADH, vorinkubiert oder aufbewahrt, so genügten bereits geringste Mengen des reduzierten Pyridinnucleotids,

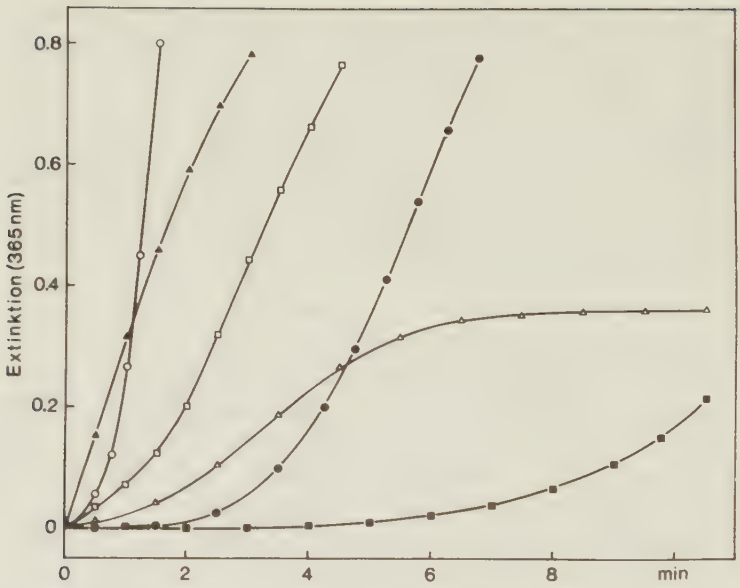


Abb. 17: Abhängigkeit der Dauer der Anlaufphase von verschiedenen Reaktionsbedingungen

Alle Reaktionsansätze (je 3 ml) enthielten 50 mM H_2-gesättigten Tris-HCl-Puffer (pH 8,0). Die Konzentrationen der anderen Ansätze wurden wie folgt variiert:

- ■ 5 mM NAD; 4,5 µg Protein (reines Enzym)
- ● 0,8 mM NAD; 4,5 µg Protein (reines Enzym)
- △ 0,1 mM NAD; 4,5 µg Protein (reines Enzym)
- □ 0,8 mM NAD; 200 µg Protein (Rohextrakt)
- ▲ 0,8 mM NAD; 4,5 µg Protein (reines Enzym); 0,1 mM NADH
- ○ 0,8 mM NAD; 40 µg Protein (reines Enzym)

um das Enzym zu aktivieren, die Anlaufphase vollständig aufzuheben. Dies konnte aber auch ohne Vorinkubation erreicht werden, wenn entsprechend größere Mengen NADH (0,1 mM bei Anwendung der unter Abbildung 16 angegebenen Bedingungen) dem Reaktionsansatz direkt beigefügt wurden.

3. Die Anlaufphase der NAD-Reduktion war beim Rohextrakt-Enzym um über die Hälfte kürzer als beim reinen Enzym (Abbildung 17). Diese Differenz lag nicht in der Abhängigkeit vom Reinheitsgrad des Enzyms begründet, sondern war darauf zurückzuführen, daß das Rohextrakt-Enzym noch geringe Mengen NADH- bzw. NADH und Wasserstoff gebunden hielt, die auch durch einmalige Gelfiltration auf Sephadex G-25 noch nicht vollständig entfernt werden konnten. Bereits in Kapitel 1.5. wurde die Richtigkeit dieser Annahme belegt, die sich begründete auf mehrere Beispiele für identisches Verhalten von Rohextrakt-Enzym und dem als "teilreduziert" definierten, reinen Enzym (siehe dortiges Kapitel).
4. Auch der Einsatz von Reduktionsmitteln und die Einwirkung von UV-Licht auf das Enzym vermochten die Anlaufphase der NAD-Reduktion vollständig auszuschalten.
5. Überraschend war der von NAD ausgehende Einfluß: Es verzögerte die Anlaufphase, verminderte die Affinität der Hydrogenase zum H_2 und wirkte quasi als "Gegenspieler" zum NADH. Wurde die für die Reaktionsgeschwindigkeit optimale NAD-Konzentration von 0,8 mM eingesetzt, dauerte die Anlaufphase 5 min an, bei einer Konzentration von 5 mM betrug sie 12, bei einer Konzentration von 0,05 mM dagegen nur 2 min (Abbildung 17). Je nach eingesetzter NAD-Konzentration waren auch sehr unterschiedlich hohe NADH-Konzentrationen zur Überwindung der Anlaufphase aufzuwenden.

Im Diskussionsteil dieser Arbeit sollen mögliche Begründungen für die Reaktionsanlaufphase, die Einwirkung des Sauerstoffs, der Reaktivierungsmechanismus und die Rolle, die NADH spielt, diskutiert werden.

3.1.2. Ursachen für die frühzeitige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit

Die Reaktivierung und Reduzierung der Hydrogenase durch NADH bedingt gleichzeitig eine extreme Instabilität des Enzyms und den damit verbundenen rasch einsetzenden Inaktivierungsprozeß. Dies wurde in Kapitel 1.5. ausführlich auch anhand mehrerer Beispiele dargestellt und nachgewiesen. Die frühzeitige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit ist daher in erster Linie als eine Reaktionsinaktivierung anzusehen. Man kann sogar sagen, gemessen an der in den Stabilitätsversuchen demonstrierten schnell eintretenden Denaturierung des aktiven Enzyms (über 60% Aktivitätsverlust nach 5 min Vorinkubation bei 30°C), daß die 1-2minütige lineare Phase der Reaktion vergleichsweise lang, die Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit aber vergleichsweise gering ist. Wie ist das zu erklären?

NADH bewirkt bei niederen Substratkonzentrationen eine Affinitätserhöhung gegenüber H_2 und NAD, die sich in sichtbarer oder mit H_2 als begrenzendem Substrat in sogar immens gesteigerter Aktivität äußert (siehe Kapitel 3.8.2.). Da die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) unverändert bleibt, muß folgerichtig die Aktivitätssteigerungsrate mit zunehmender Substratkonzentration abnehmen, mit abnehmender Konzentration aber zunehmen.

Da nun während der Reaktion die Konzentration der Substrate laufend ab-, die NADH-Konzentration aber laufend zunimmt, ist die Reaktion theoretisch über die Reaktivierungsphase hinaus mit einer ständigen relativen Aktivitätssteigerung verbunden, die der Reaktionsinaktivierung entgegenwirkt und diese erheblich abschwächt.

Eine Produkthemmung durch NADH, wie sie von AHRENS und SCHLEGEL (1966) beschrieben wurde, trifft mit Sicherheit nicht zu. Aufgrund der Komplexität der NADH-Wirkungen ist es ausgeschlossen, eine Produkthemmung als solche überhaupt analysieren zu können. Da sich V_{max}, wie schon oben erwähnt, auch in Gegen-

wart von NADH nicht ändert, muß eine Produkthemmung, so vorhanden, kompetitiven Charakter haben. Eine kompetitive Produkthemmung muß aber unsichtbar,unidentifiziert bleiben, weil die von ihr bedingte Affinitätsverminderung des Enzyms gegenüber den Substraten überlagert wird durch die ebenfalls NADH-bedingten und sich auf negative Kooperativität begründenden Affinitätsveränderungen.

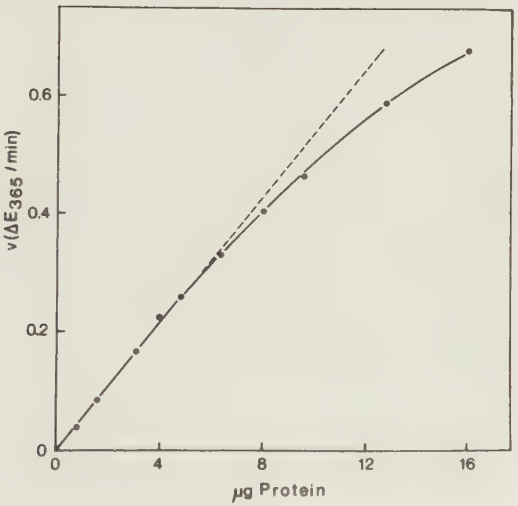


Abb. 18: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM H_2-gesättigter Tris-HCl-Puffer (pH 8,0), 0,8 mM NAD und die in der Abbildung aufgeführten Enzymkonzentrationen.
Inkubationstemperatur: 30°C.

3.2. Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Enzymkonzentration

Die Umsatzgeschwindigkeit der Hydrogenase war der eingesetzten Enzymmenge bis zu einer Proteinkonzentration von 6,5 µg pro Ansatz direkt proportional (Abbildung 18). Bei 365 nm entsprach das einer Extinktionsänderung (NAD-Reduktion) von etwa 0,350/min.

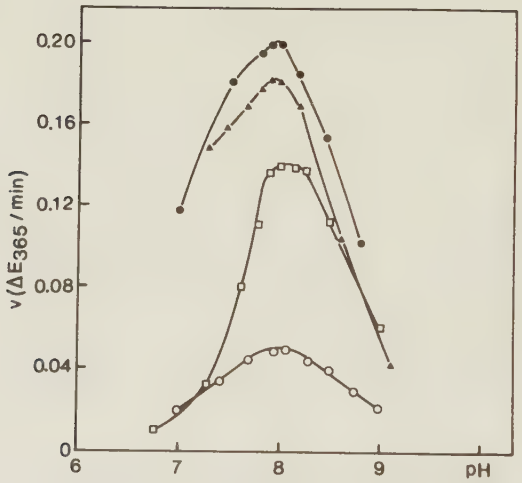


Abb. 19: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der Wasserstoffionenkonzentration

Der Reaktionsansatz enthielt 0,8 mM NAD und 4 µg Protein in folgenden Pufferlösungen:

- ● 50 mM Tris-HCl-Puffer
- ▲ 50 mM TEA-Puffer
- □ 67 mM Kaliumphosphatpuffer
- ○ 67 mM Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (1909)

3.3. pH-Optimum

Die Abhängigkeit der NAD-Reduktion von der Wasserstoffionenkonzentration wurde in Tris-HCl-, TEA- und Phosphatpuffer gemessen. Für alle Puffersysteme wurde ein pH-Wert um 8,0 als Optimum ermittelt (Abbildung 19). Die von PFITZNER et al. (1970) gefundene Verschiebung des pH-Optimums auf 8,5 in KP-Puffer konnte nicht bestätigt werden. Ein stark hemmender Einfluß wurde durch den neben Kalium auch Natrium enthaltenden Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (1909) ausgeübt. In ihm erreichte die Hydrogenase nur ca. 1/3 ihrer maximal möglichen Aktivität. Dennoch blieb auch in diesem Fall das pH-Optimum unverändert.

3.4. Temperaturoptimum und Aktivierungsenergie (ΔH)

Aus Abbildung 20a geht hervor, daß die Hydrogenase unter den gewählten Testbedingungen ihre maximale Reaktionsgeschwindigkeit bereits bei einer Temperatur von 33°C erreichte.
Die Aktivierungsenergie (ΔH) stellt eine Barriere dar, die überwunden werden muß, bis das Substrat den nötigen Energiegehalt gewonnen hat, um in das Reaktionsprodukt überführt zu werden (LEHNINGER, 1970). Enzyme, die als Biokatalysatoren wirken, setzen die Aktivierungsenergie herab. Die Höhe der Aktivierungsenergie ist daher als ein Maß für die katalytische Wirksamkeit eines Enzyms anzusehen.
ΔH wurde nach der Gleichung

$$\Delta H = Ea - RT$$

bestimmt, wobei Ea die Arrhenius-Konstante, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur (° Kelvin) darstellt. Die Arrhenius-Konstante konnte durch Auftragung von log V gegen 1/T (Abbildung 20b) aus der Steigung der Kurve im linearen Bereich ermittelt werden.
Der für die Aktivierungsenergie der NAD-Reduktion kalkulierte Wert betrug 14,3 kcal/Mol. C.pasteurianum muß für die Aktivie-

rung von H_2 (Reduktion von Ferredoxin bzw. MV) einen nahezu identisch hohen Energiebetrag (14,6 kcal/Mol) aufwenden (KLEINER und BURRIS, 1970). Die ΔH-Werte hydrogenasekatalysierter Reaktionen anderer Organismen streuen in einem Bereich zwischen 7 und 15 kcal/Mol.

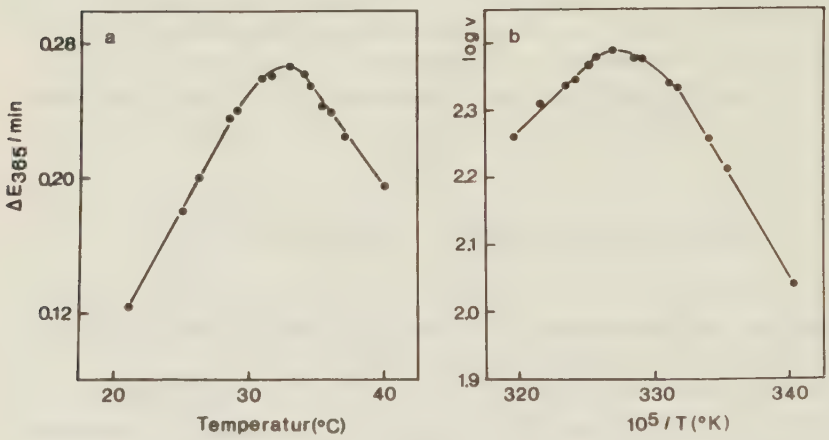


Abb. 20: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der Inkubationstemperatur

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0; H_2-gesättigt); 0,8 mM NAD und 4,5 µg Protein. Die Inkubationstemperatur wurde wie in der Abbildung angegeben variiert. Ihr exakter Wert wurde direkt im Reaktionsgemisch nach Erreichen konstanter Reaktionsgeschwindigkeit bestimmt.

a: Optimumskurve

b: Arrhenius-Auftragung zu a

3.5. Einfluß hoher Salzkonzentrationen auf die Enzymaktivität

Die Hydrogenase erwies sich als insgesamt empfindlich gegenüber hohen Salzkonzentrationen. Besonders Natrium, sowohl in Verbindung mit Chlorid-Ionen, als auch in Verbindung mit Phosphat-Ionen hatte eine starke aktivitätshemmende Wirkung (Tabelle 6). Die Gegenwart von 0,2 M NaCl im Testansatz reduzierte die Reaktionsrate um 75%, Na_3PO_4 in der gleichen Konzentration zugesetzt, führte gar zu einer 90%igen Aktivitätshemmung. Die Wirkungsweise der Na^+-Ionen erklärt auch den vom Phosphatpuffer nach SÖRENSEN (1909) ausgehenden stark hemmenden Einfluß (vgl. Kapitel 3.3. und pH-Optimumskurve Abbildung 19). Die Empfindlichkeit gegenüber hohen NaCl-Konzentrationen wurde bereits, wenn auch nicht in solch eklatanter Ausprägung bei den Hydrogenasen von P.ruhlandii (BONE et al., 1963) und N.opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1974) gefunden.
Eine ebenfalls augenfällige, wenngleich weniger deutliche Verminderung der Hydrogenaseaktivität wurde durch Ammoniumsalze hervorgerufen (siehe Tabelle 6). Weniger nennenswert waren die Hemmeffekte, die von Clorid-, Nitrat-, Phosphat-, Carbonat-, Sulfat- und Kalium-Ionen ausgingen.
Zu vermerken ist weiterhin, daß 1. die beobachteten Aktivitätshemmungen durch Dialyse aufhebbar, also reversibel waren, und daß 2. die Stabilität des Enzyms durch die Gegenwart der Salze nicht beeinträchtigt wurde. REPASKE (1962) stellte eine stark stabilitätsvermindernde Wirkung von Ammoniumsulfat auf die lösliche Hydrogenase des von ihm untersuchten A.eutrophus-Stammes fest. Umso überraschender war der Befund, daß sich Ammoniumsulfalt trotz seines aktivitätshemmenden Einflusses als ausgezeichneter Stabilisator der gereinigten H_2-Dehydrogenase (H_2-DH) von H16 bewährte (vgl. Kapitel 1.6.).

Tab. 6: Die Wirkung von Salzen auf die Rate der NAD-Reduktion

Salz	Konzentration (M)	% Aktivität	Salz	Konzentration (M)	% Aktivität
ohne Zusatz	-	100	KH_2PO_4/ Na_2HPO_4	0,01	83
KCl	0,01	92		0,2	29
	0,2	71	NaCl	0,01	79
$KHCO_3$	0,01	100		0,2	25
	0,2	93	Na_3PO_4	0,01	60
KNO_3	0,01	90		0,2	10
	0,2	72	NH_4Cl	0,01	83
KH_2PO_4	0,01	96		0,2	45
	0,2	75	$(NH_4)_2SO_4$	0,01	94
				0,2	66

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM H_2-gesättigten Tris-HCl-Puffer (pH 8,0); 0,8 mM NAD; 5 µg Protein; die Salze, in 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) gelöst, wurden bis zu den in der Tabelle angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt. Die KH_2PO_4- und die Na_3PO_4-Lösung mußten mit KOH bzw. HCl auf pH 8,0 nachgestellt werden. Die Gesamtionenstärke im Reaktionsansatz betrug je nach zugesetzter Salzkonzentration 0,06 oder 0,25 M.

3.6. Abhängigkeit des Aktivitätsoptimums vom Puffersystem

Zur Ermittlung optimaler Reaktionsbedingungen war es erforderlich, neben der Bestimmung des Temperatur- und pH-Optimums und anknüpfend an die Darstellung des Einflusses hoher Salzkonzentrationen auf die Hydrogenaseaktivität, auch die Abhängigkeit der Reaktionsrate von der Molarität verschiedener Puffersysteme zu prüfen.

Tab. 7: Abhängigkeit der NAD-Reduktionsrate von der Pufferkonzentration

Pufferkonzentration (M)	E_{365} pro min		
	Tris-HCl-Puffer	TEA-Puffer	KP-Puffer
0,4	0,146	0,124	0,100
0,2	0,184	0,156	0,120
0,1	0,194	0,170	0,138
0,05	0,198	0,174	0,166
0,02	0,146	0,150	0,178
0,01	0,118	0,128	0,168

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: H_2-gesättigten Puffer (pH 8,0), deren Zusammensetzung und Konzentration wie in der Tabelle angegeben variiert wurden; 0,8 mM NAD und 3,5 µg Protein.

Absolutes Aktivitätsmaximum wurde erzielt in 0,05 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,0). Die Hydrogenaseaktivitäten in optimal konzentrierten TEA- und KP-Pufferlösungen lagen aber nur unwesentlich darunter (Tabelle 7). Während TEA wie Tris-HCl im Konzentrationsbereich um 0,05 M ein schwaches Optimum ausbildeten, war die Hydrogenase im KP-Puffer, entsprechend ihrer Empfindlichkeit gegenüber hohen Ionenstärken, in niedermolaren Lösungen (Optimum: 0,02 M) am aktivsten.

3.7. Wirkung von Cofaktoren auf die Reaktionsgeschwindigkeit

Eine schlüssige Aussage darüber, ob die H_2-DH von H16 cofaktorbedürftig ist oder nicht, läßt sich nach den Untersuchungen

der bisher vorliegenden Arbeiten nicht treffen. Potentielle Aktivatoren wurden entweder nur sporadisch oder in zellfreien Extrakten eingesetzt. Darüber hinaus widersprachen sich die Ergebnisse der verschiedenen Autoren.
Die Gelfiltration des Rohextraktes von H16 auf Sephadex G-25 (Kapitel 1.2.) führte nicht zu einer Aktivitätsminderung, sondern sogar zu einem geringfügigen Anstieg der Hydrogenaseaktivität. Dieses Ergebnis wurde als wichtiger Hinweis dafür gewertet, daß die Hydrogenase kein Bedürfnis an dissoziablen, für die Enzymkatalyse essentiellen Cofaktoren besitzt. Diese Aussage sollte durch die Untersuchung des Einflusses einzeln zugesetzter Cofaktoren auf das gereinigte Enzym überprüft werden. Die Wirkung von Metallionen, Flavinen, Adenosinphosphaten und NADH ist in Tabelle 8 zusammengestellt. Die in der Tabelle angegebenen Konzentrationen wurden als die jeweilig wirksamsten ermittelt. Die auf das oxidierte Enzym ausgeübten Aktivierungseffekte wurden der Übersichtlichkeit halber nur dann mit angegeben, wenn sie sich von den Effekten, die auf das reduzierte Enzym ausgeübt wurden, sichtbar unterschieden.
EBERHARDT (1966) konnte die NAD-Reduktionsrate der löslichen Hydrogenase von H16 (zellfreier Extrakt) durch Zusatz von Eisen (II)ammoniumsulfat bzw. von Salzen der quantitativ fast gleich wirkenden Metalle Mangan, Kobalt und Nickel nahezu verdoppeln.

PFITZNER et al. (1970) untersuchten das teilweise angereicherte Enzym und registrierten lediglich einen durch Mg^{++} bewirkten schwach aktivierenden Einfluß von 24%.
Auf das reine Enzym hatte keines der hier getesteten Metallionen irgendeine stimulierende Wirkung, weder Fe^{++}, Mn^{++}, Ni^{++} oder Co^{++}, noch Mg^{++}. Dies gilt für katalytische Konzentrationen ebenso wie für höhermolare Zusätze (1-5 mM). Auch eine 2-5 minütige Vorinkubation des Enzyms mit den Metallverbindungen blieb ohne Effekt. Dagegen beeinträchtigten Nickel und Cobalt und in noch stärkerem Maße Zink und die als Enzymgifte bekannten Salze von Kupfer, Silber und Quecksilber die Reaktionsgeschwindigkeit. Auf deren Wirkung soll im Kapitel "Hemmstoff-

Tab. 8: Der Einfluß von Metallionen, Flavinen, Adenosinphosphaten und NADH auf die Hydrogenaseaktivität

Zusatz	Konzentration (mM)	% Aktivität reduziertes Enzym	% Aktivität oxidiertes Enzym
ohne Zusatz	-	100	100
$MnCl_2$	0,1	100	
$MgCl_2$	0,1	100	
$FeCl_2$	0,1	100	
$CoCl_2$	0,1	86	
$NiCl_2$	0,1	80	
Na_2MoO_4	0,1	100	
FMN	0,005	125	105
FAD	0,005	100	
Riboflavin	0,005	75	
AMP	0,1	100	
ADP	0,1	130	140
ATP	0,1	130	140
ADP + ATP	0,1 + 0,1	130	140
NADH	0,075	117	
NADH + ATP	0,075 + 0,1	133	167
NADH + FMN	0,075 + 0,005	195	
FMN + ATP	0,005 + 0,1	200	165
NADH + ATP + FMN	0,075 + 0,1 + 0,005	235	

Die Cofaktoren wurden bis zu den in der Tabelle angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt. Als reduzierte Hydrogenase wurde das Enzym einer Lösung verwendet, die 15 min mit H_2 durchspült und anschließend nach Zusatz von 15 µM NADH 6 Std bei 4°C unter molekularem Wasserstoff aufbewahrt wurde. 5 µM NADH entsprachen nach Zusatz der Enzymlösung (5 µl) in den Reaktionsansatz einer Endkonzentration von 0,0085 µM. Diese Konzentration war derart gering, daß sie weder einen Einfluß auf die Enzymaktivität hatte, noch die Konzentration des als Cofaktor eingesetzten NADH verfälschte. Die Begriffe "oxidiert" und "reduziert" beziehen sich nur auf den Zustand des Enzyms zum Zeitpunkt der Zugabe in den Reaktionsansatz und berücksichtigen nicht den während der Reaktion ablaufenden Reduktionsprozeß.

analytische Untersuchungen" detaillierter eingegangen werden.
Bei der Charakterisierung der Wirkung von Flavinen konnte ebenfalls keine volle Übereinstimmung mit den Ergebnissen von EBERHARDT und PFITZNER et al. erzielt werden. EBERHARDT (1966) fand eine deutliche Beschleunigung der NAD-Reduktion, sowohl durch FMN, als auch durch FAD. PFITZNER (persönliche Mitteilung) dagegen konstatierte keinerlei Aktivitätsveränderungen in Gegenwart dieser Cofaktoren.
Bei der Untersuchung des gereinigten Enzyms stellte sich aber heraus, daß grundsätzlich unterschieden werden muß zwischen der FMN-Wirkung auf das reduzierte Enzym einerseits und auf das oxidierte Enzym andererseits: Das reduzierte Enzym wurde stimuliert, nicht aber das Enzym, das zum Zeitpunkt der Zugabe im oxidierten, nicht reaktionsfähigen Zustand vorlag.
Der Stimulierungseffekt betrug aber, wie schon im Rohextrakt, nie mehr als 25%. FAD konnte FMN nicht ersetzen. Höhere Konzentrationen als 10 µM wirkten aktivitätshemmend.
Eine stärkere Wirkung ging von ATP und ADP aus, die gegeneinander austauschbar waren. Umgekehrt wie FMN aktivierten sie die oxidierte Hydrogenase stärker als die reduzierte (40% gegenüber 30% Aktivierung). AMP blieb wirkungslos.
Komplexerer Natur war der von NADH ausgehende Einfluß, der schon in Zusammenhang mit der Charakterisierung der Reaktionskinetik teilweise beschrieben und diskutiert wurde.
Es konnte gezeigt werden, daß NADH neben seiner reaktivierenden und destabilisierenden Wirkung auf das Enzym die Affinität des Enzyms gegenüber seinem Substraten erhöht, also als Effektor fungiert, der allerdings nicht an Regulation und Enzymallosterie geknüpft ist (vgl. "Diskussion"). Diese Affinitätserhöhung hatte auch eine über die Reaktivierungsphase hinausgehende Aktivitätssteigerung zur Folge, die im Bereich sättigender Substratkonzentrationen unscheinbar (Tabelle 8), im Bereich niederer Konzentrationen aber, insbesondere mit H_2 als begrenzendem Substrat, enorm hoch war und relative Werte bis zu über 1000% erreichte (siehe Kapitel 3.8.2. und Abbildung 23).

AHRENS und SCHLEGEL (1966) fanden in Gegenwart von NADH keine Steigerung, sondern eine Verringerung der NAD-Reduktionsrate, die sie auf eine Produkthemmung zurückführten. Dieser Irrtum (vgl. "Ursachen für die frühzeitige Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit", Kapitel 3.1.2.) beruhte auf Reaktionsbedingungen, die die Instabilität des reduzierten Enzyms nicht berücksichtigten: Der Extrakt wurde mit NADH vorinkubiert, ehe nach Evakuieren und Begasen der Thunberg-Küvette die Reaktion gestartet wurde. Eigene Erfahrungen (vgl. die in Kapitel 1.5. angegebenen Beispiele) lassen darauf schließen, daß nach einer solchen Vorbehandlung des Extrakts ein großer Teil der Hydrogenase bereits denaturiert war, ehe die Reaktion überhaupt begann.

Erwähnenswert ist weiterhin, daß sich die durch FMN, ATP und NADH hervorgerufenen Aktivierungseffekte bei kombinierter Zugabe der Cofaktoren nicht abschwächten, sondern sich addierten oder sogar verstärkten. In Gegenwart aller drei Faktoren wurde immerhin eine Beschleunigung der Reaktionsgeschwindigkeit um das 2,3fache erreicht (Tabelle 8). Trotz dieser recht ansehnlichen Aktivierungsrate ist die Aussage, daß die Hydrogenase keine dissoziablen Cofaktoren braucht, nicht widerlegt. Zugesetztes FMN und ATP, deren Wirkung auf das reine Enzym nicht größer war als auf das Rohextrakt-Enzym, sind als unspezifische Aktivitoren anzusehen, und NADH kann als Effektor gelten, der das intakte Enzym in eine reaktionsfähige Form umwandelt und die Affinität zu dem Substraten erhöht. Keine dieser Verbindungen aber ist zu betrachten als ein an der Enzymkatalyse essentiell beteiligter Cofaktor. Die Wirkungslosigkeit von Metallionen und die Bedürfnislosigkeit an zugesetzten Cofaktoren insgesamt schlossen aber die Möglichkeit nicht aus, daß die Hydrogenase über festgebundene, nicht dissoziable Cofaktoren verfügt, was sich in späteren Untersuchungen auch tatsächlich bestätigen ließ.

3.8. Substratsättigungen der Hydrogenase

Über kinetische Charakteristiken (Substratsättigungen) von Hydrogenasen ist wenig bekannt. Angaben in der Literatur erstrekken sich im wesentlichen auf die Mitteilung von K_m-Werten der Substrate. Über mögliche regulatorische Einflüsse von Effektoren und Endprodukten, sowie über den Vergleich des oxidierten und reduzierten Enzyms liegen keine Informationen vor.
Die in diesem Kapitel geschilderten Untersuchungen hatten deswegen zum Ziel, über den bisherigen Rahmen der Aussagen hinaus zu gelangen und neue zu berücksichtigende Aspekte aufzuzeigen.

3.8.1. NAD-und H_2-Sättigung des oxidierten und reduzierten Enzyms

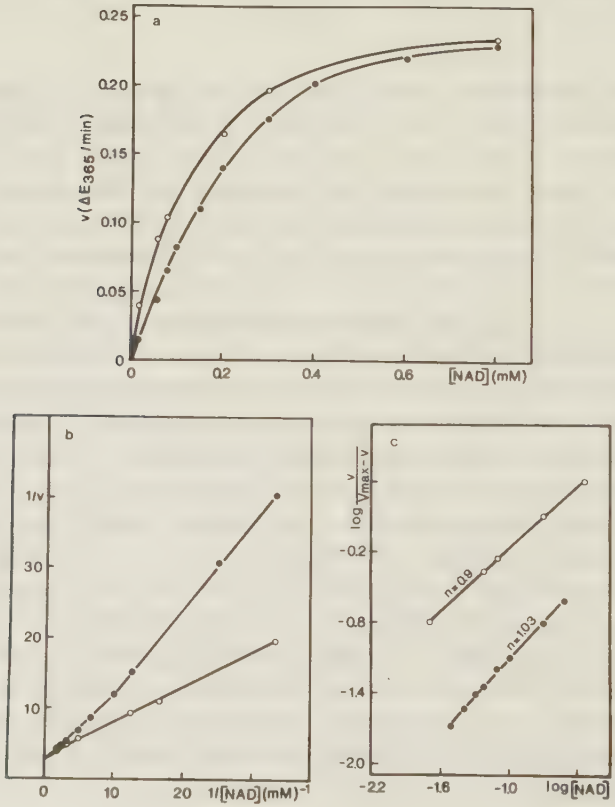
Da die Hydrogenase ein Zweisubstrat-Enzym ist, mußten für beide Substrate, H_2 und NAD, Sättigungskurven aufgenommen werden, wobei die Konzentration des einen Substrats variiert, das andere Substrat dem Reaktionsansatz aber in gleichbleibend sättigender Konzentration zugegeben wurde.
Es sollen zunächst die Substratsättigungskurven des oxidierten Enzyms betrachtet werden. Sie zeigten für beide Substrate einen hyperbolischen Verlauf (Abbildung 21a und 22a). Die reziproke Auftragung der Versuchswerte nach Lineweaver-Burk 1/v gegen 1/[s] (Abbildung 21b und 22b) führte jedoch zu zweiphasigen Kurven, d.h. zu Geraden, die nach oben abgeknickt waren. Die durch den Knick bedingte Abweichung vom ersten linearen Abschnitt war nicht signifikant, aber für beide Substrate reproduzierbar. Sie wurde sowohl in frisch bereiteten Extrakten als auch in längere Zeit eingefrorenen Enzymlösungen gefunden. Um zu prüfen, ob dieser Zweiphasigkeit der Kurven eine positive Kooperativität zugrunde liegt, wurden die Meßdaten nach der Hill-Gleichung aufgetragen. Durch die Punkte ließen sich Geraden legen, die keine "breaks" aufwiesen und deren Steigungen (n =

1,03 bzw. 1,08) nicht auf das Auftreten kooperativer Effekte hindeuteten (Abbildung 21c und 22c).
Ähnliche zweiphasige Sättigungskurven, wie die hier geschilderten, sind u.a. auch für die DAHP-Synthase von Neurospora crassa (DOY, 1968) und für das gleiche Enzym von A.eutrophas H16 (FRIEDRICH und SCHLEGEL, 1975) gefunden worden. Sie sind als charakteristisch für Hyperbeln anzusehen, deren Tangenten sich nicht im rechten Winkel schneiden.
Für die Abhängigkeit von der Wasserstoffkonzentration bei NAD-Sättigung ergab sich eine Michaeliskonstante K_m^{H2} von 0,25 mM. Für NAD wurde ein K_m-Wert ermittelt, der etwa doppelt so hoch lag (K_m^{NAD} = 0,56 mM).

Wurde die Hydrogenase durch Aufbewahrung unter H_2 in Gegenwart katalytischer Mengen NADH reduziert, so zeigte das von Anbeginn mit maximal möglicher Aktivität reagierende Enzym gegenüber dem oxidierten Enzym ein auffallend abweichendes kinetisches Verhalten: Bei unveränderter maximaler Reaktionsgeschwindigkeit (V_{max}) war die Affinität gegenüber beiden Substraten erhöht, gegenüber NAD weniger erheblich, um so prägnanter aber gegenüber H_2, was sich in enormen Aktivitätssteigerungen bei niedrigen Substratkonzentrationen ausdrückte. Z.B. wurde bei Substratkonzentrationen von 0,8 mM (NAD) und 0,01 mM (H_2) die Aktivität, bezogen auf die Reaktionsraten, die mit dem oxidierten Enzym erhalten worden waren, mehr als versechsfacht.
Ein der Affinitätserhöhung gemäßer K_m-Wert ließ sich nicht bestimmen, weil die Affinität mit steigender Substratkonzentration wieder abnahm. Dieser Erscheinung lag das Phänomen der negativen Kooperativität zugrunde, die aus den Sättigungskurven Abbildung 21a und 22a) allein nicht ablesbar war. Diese Kurven entsprechen rein qualitativ einer Michaelis-Menten-Kinetik, wenngleich ihr Verlauf bei niedrigen Substratkonzentrationen einen steileren Anstieg und eine entsprechend früher eintretende Abflachung zeigte. Die reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk ergab für die H_2-Abhängigkeit eine für negative Kooperati-

vität charakteristische nach unten weisende konkave Kurve (Abbildung 22b). Der mit 0,4 weit unter 1 liegende Wert des Hill-Koeffizienten (Abbildung 22c) unterstrich das Vorliegen negativer kooperativer Effekte. Der für die NAD-Abhängigkeit ermittelte Hill-Koeffizient von n = 0,9 war indikativ für die zumindest vorhandene Neigung zu einer, wenn auch schwachen Kooperativität.

Kooperativität bezeichnet die durch Substrate und Effektoren induzierten Wechselwirkungen zwischen den Bindungsstellen eines



Enzyms. Positive Kooperativität eines Substrats bedeutet nach KOSHLAND et al. (1966), daß durch die Bindung eines Substratmoleküls die Bindung des nächsten Moleküls erleichtert, also die Affinität weiterer Substratbindungsstellen gegenüber dem Substrat erhöht wird. Negative Kooperativität bedeutet umgekehrt abnehmende Affinität des Enzyms gegenüber dem Substrat mit steigender Substratkonzentration. Genau das ist bei der reduzierten, in der reaktionsfähigen Form vorliegenden Hydrogenase der Fall: Hohe Affinität gegenüber H_2 bei niedrigen Substrat-

Abb. 21: Abhängigkeit der Aktivität der Hydrogenase von der NAD-Konzentration

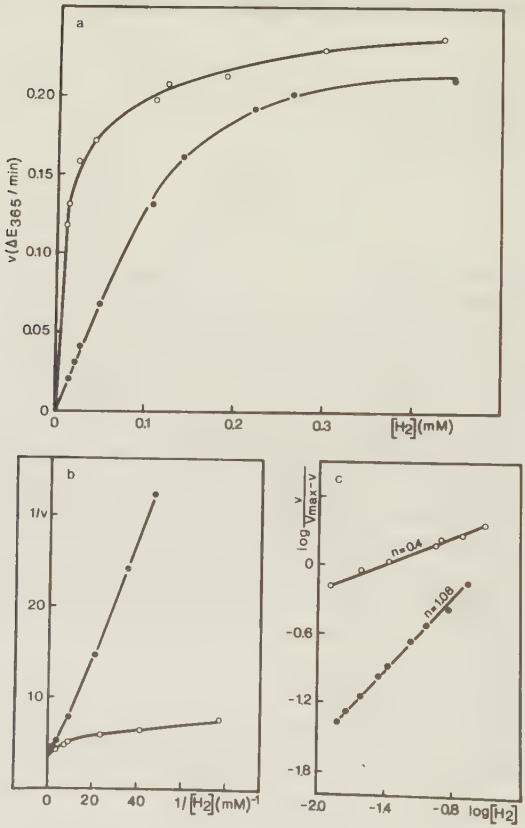
Der auf 30°C vorinkubierte Tris-HCl-Puffer (50 mM; pH 8,0), die NAD-Lösung, ebenso die leere, mit einer Gummikappe verschlossene Küvette wurden mit O_2-freiem Wasserstoff durchströmt. Nach dem Einfüllen der Pufferlösung in die Küvette wurden nacheinander Enzym- (4 µg Protein in 8 µl) und NAD-Lösung eingespritzt. Die NAD-Konzentration variierte wie in der Abbildung angegeben. Die Sättigungskonzentration des Wasserstoffs im Reaktionsgemisch betrug 0,6 mM. Als "reduzierte" Hydrogenase (o) wurde das Enzym einer Lösung verwendet, die 15 min mit H_2 durchspült und anschließend nach Zusatz von 5 µM NADH 6 Std bei 4°C unter H_2 aufbewahrt worden war. Als "oxidiert" (●) wurde das unvorbehandelte, unter Luft aufbewahrte Enzym bezeichnet.

a: NAD-Sättigungskurve

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a

c: Hill-Auftragung zu a

konzentrationen, in der Folge aber über einen weiten Sättigungsbereich Abnahme der Affinität und nur noch geringfügiger Anstieg der Reaktionsgeschwindigkeit. Diese Kinetik spiegelt sich in der doppelt-reziproken Auftragung wider, die nicht zu einer Geraden, sondern zu einer abwärts gekrümmten Kurve führt.



3.8.2. Erzeugung negativer Kooperativität durch NADH

Bei der Differenzierung von oxidiertem und reduziertem Enzym ist folgendes zu berücksichtigen: Die Begriffe "oxidiert" und "reduziert" beziehen sich nur auf den Zustand des Enzyms zum Zeitpunkt der Zugabe des Enzyms in den Reaktionsansatz. Vom Moment des Reaktionsstarts an ist der Zustand des Enzyms nicht statisch, sondern verändert sich fortlaufend. Molekularer Wasserstoff und das entstehende NADH sorgen für eine ständige Erhöhung des Reduktionsgrads des Enzyms. In dem von der Zeit linear abhängigen Aktivitätsbereich, in dem die Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, die auch zur Aktivitätsbestimmung herangezogen wird, liegt auch das ursprünglich als "oxidiert" eingesetzte Enzym schon bis zu einem bestimmten Ausmaß reduziert vor. Weniger die Frage also, ob das oxidierte oder reduzierte Enzym in den Test eingesetzt wird, sondern vielmehr der Reduktions-

Abb. 22: Abhängigkeit der Aktivität der Hydrogenase von der H_2-Konzentration

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0); 0,8 mM NAD; 4 µg Protein. Puffer-, NAD-Lösung und Küvette wurden vor dem Zusammengeben der einzelnen Bestandteile des Reaktionsgemisches (vgl. Beschreibung unter Abb. 21) mit verschiedenen H_2-N_2-Gemischen gesättigt. Die exakte, in der Küvette wirksame Wasserstoffkonzentration wurde wie unter "Methoden" beschrieben bestimmt.

a: H_2-Sättigungskurve

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a

c: Hill-Auftragung zu a

● oxidiertes Enzym

o reduziertes Enzym

grad des Enzyms zum Zeitpunkt der Aktivitätsbestimmung dürfte entscheidend für die Ausprägung negativer Kooperativität sein. Diese Vorstellung wurde durch den Einfluß verschiedener, dem Reaktionsansatz direkt zugesetzter NADH-Mengen bestätigt: Die Abbildungen 23a-c demonstrieren am Beispiel der H_2-Abhängigkeit, daß NADH negative kooperative Effekte erzeugte, die umso deutlicher in Erscheinung traten, je höher die eingesetzte NADH-Konzentration war.

Der Zusatz von 0,15-0,2 mM NADH unmittelbar vor dem Reaktionsstart durch NAD bewirkte etwa das Ausmaß an Kooperativität, das auch erreicht wurde, wenn ein durch sechsstündige Aufbewahrung unter H_2 in Gegenwart von 0,005 mM NADH reduziertes Enzym verwendet wurde. NADH-Zusätze über Konzentrationen von 0,2 mM hinaus verstärkten noch sichtbar die kooperativen Effekte, d.h. die Sättigungskurven (Abbildung 23a) verliefen bei niedrigen Substratkonzentrationen entsprechend höherer Affinitäten noch steiler, die nach unten konkaven Kurven in der Lineweaver-Burk-Auftragung waren noch ausgeprägter (Abbildung 23b), und die Werte der Hill-Koeffizienten lagen noch niedriger. In Gegenwart von 0,4 mM NADH betrug die Steigung des Hill-plots 0,28 (Abbildung 23c). Der beobachtete Einfluß von NADH auf die H_2-Sättigung wurde in erheblich abgeschwächter Form auch auf die NAD-Sättigung ausgeübt. Er drückte sich aber weniger in der optisch kaum wahrnehmbaren veränderten Charakteristik der Kinetiken aus, sondern eher darin, daß parallel zum Anstieg der NADH-Konzentration der Hill-Koeffizient allmählich kleiner wurde. In Gegenwart einer Konzentration von 0,4 mM NADH erreichte er einen Wert von 0,82, der als Zeichen für das Vorliegen schwacher Kooperativität angesehen werden kann. Der Einsatz höherer Konzentrationen NADH war aus meßtechnischen Gründen nicht möglich.

Es soll noch erwähnt werden, daß NADH neben der von ihr bewirkten negativen Kooperativität (heterotrope Wechselwirkungen) auch möglicherweise eine kompetitive Produkthemmung auslöst (vgl. Kapitel 3.1.2.), die einerseits infolge der Überlagerung kooperativer Effekte unerkannt bleiben muß, die aber anderer-

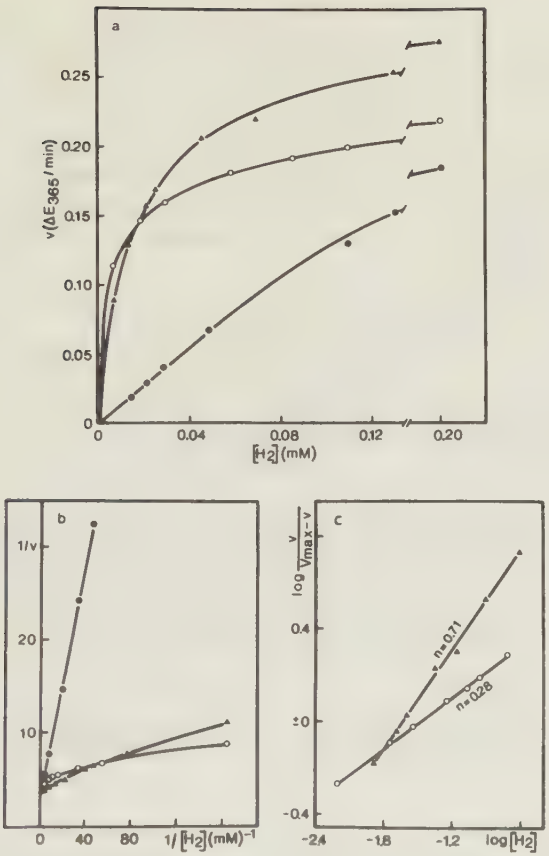


Abb. 23: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der H_2-Konzentration in Abwesenheit und Gegenwart von NADH

Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen waren den Angaben unter Abb. 22 entsprechend. NADH wurde dem Ansatz unmittelbar vor dem Reaktionsstart durch NAD zugesetzt.

a: Sättigungskurven
b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a
c: Hill-Auftragung zu a

● ohne Zusatz
○ + 0,4 mM NADH
▲ + 0,075 mM NADH

seits eben diesen Effekten entgegenwirkt und deren schwache Ausprägung mit verursacht.
Erst 1968 ist an der Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH zum ersten Mal negative Kooperativität als solche erkannt und beschrieben worden (CONWAY und KOSHLAND). Sie galt zunächst als eine seltene Erscheinung, ist inzwischen aber bei vielen Enzymen, häufig auch im Wechsel mit positiver Kooperativität auftretend, gefunden worden.
Negative Kooperativität als Phänomen regulatorischer Enzyme ist nicht mit dem Symmetrie-Modell von MONOD et al. (1965), sondern allein mit dem "sequentiellen" Modell von KOSHLAND et al. (1966) erklärbar, das auf der schon 1958 von KOSHLAND aufgestellten "induced fit"-Theorie basiert.
Im Zusammenhang mit dieser Problematik soll in der "Diskussion" die Frage erörtert werden, ob es sich bei der beobachteten negativen Kooperativität der löslichen Hydrogenase von H16 um einen regulatorischen Vorgang handelt, der sich auch auf "liganden-induzierte Konformationsänderungen" begründen läßt, oder ob es andere mögliche Erklärungen gibt.

3.8.3. NAD-Sättigungskinetik bei verschiedenen H_2-Konzentrationen

Wurde die NAD-Sättigungskurve bei verschiedenen H_2-Konzentrationen, einer sättigenden und einer nicht sättigenden, aufgenommen und die Meßwerte doppelt reziprok aufgetragen, so resultierten daraus Geraden, die sich in einem Punkt knapp oberhalb der Abszisse im vierten Quadranten schnitten (Abbildung 24).

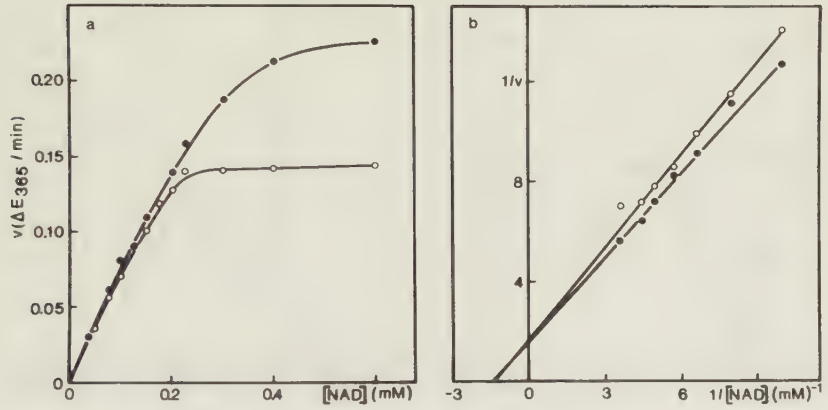


Abb. 24: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der NAD-Konzentration bei sättigender und nicht sättigender H_2-Konzentration

Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen waren den Angaben unter Abb. 21 entsprechend.

a: NAD-Sättigungskurven ● H_2-Konzentration: 0,52 mM

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a ○ H_2-Konzentration: 0,11 mM

3.8.4. H_2-Sättigungskinetik bei verschiedenen NAD-Konzentrationen

Entsprach die Kinetik der NAD-Sättigung bei verschiedenen H_2-Konzentrationen den Erwartungen, so offenbarten umgekehrt die H_2-Sättigungskurven, die in Gegenwart sättigender (0,8 mM) und nichtsättigender (0,2 mM) NAD-Konzentration erhalten wurden, ein sehr ungewöhnliches Ergebnis: Aus der doppelt-reziproken Auftragung resultierten Geraden, deren Schnittpunkt im ersten Quadranten des Koordinatensystems lag (Abbildung 25b).

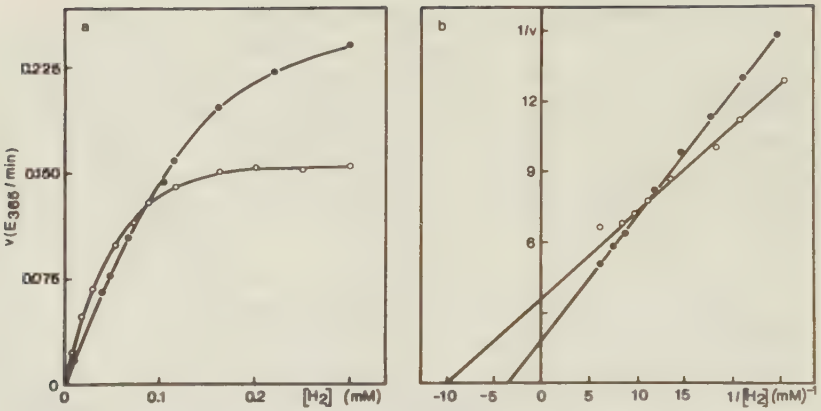


Abb. 25: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der H_2-Konzentration bei sättigender und nichtsättigender NAD-Konzentration

Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen waren den Angaben unter Abb. 22 entsprechend.

a: H_2-Sättigungskurven ● NAD-Konzentration: 0,8 mM
b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a ○ NAD-Konzentration: 0,2 mM

Das bedeutete, daß trotz wesentlicher Erniedrigung der NAD-Konzentration die Aktivität im niederen H_2-Sättigungsbereich gesteigert wurde (vgl. Abbildung 25a).
Es konnte nachgewiesen werden, daß über 0,8 mM hinausgehende NAD-Konzentrationen eine Substrathemmung verursachen (Abbildung 26). Da aber Substrathemmungen dieser Art nicht ungewöhnlich, sondern weit verbreitet sind, schied der von höheren NAD-Konzentrationen ausgehende, aktivitätshemmende Einfluß als Erklärung für die oben beschriebene kinetische Charakteristik aus.

Die einzig plausible Erklärungsmöglichkeit dagegen war folgende: Die Bindung von NAD erschwert die Bindung des zweiten Sub-

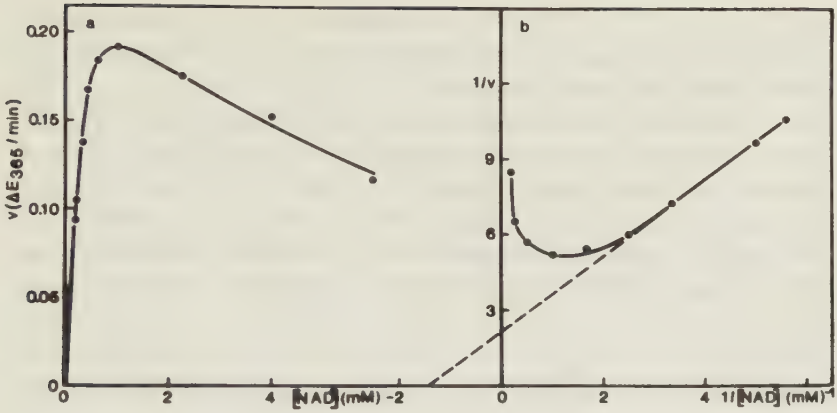


Abb. 26: Substrathemmung durch NAD

Reaktionsansatz und Reaktionsbedingungen waren den Angaben unter Abb. 21 entsprechend.

a: Sättigungskurve

b: Lineweaver-Burk-Auftragung zu a

strats, des molekularen Wasserstoffs, d.h. deren Affinität gegenüber dem Enzym wird herabgesetzt. Dies drückte sich nicht nur in veränderten K_m-Werten aus ($K_m^{H_2}$ bei 0,8 mM NAD = 0,28 mM; $K_m^{H_2}$ bei 0,2 mM NAD = 0,1 mM), sondern auch in den verlängerten Reaktionsanlaufphasen, die durch Erhöhung der NAD-Konzentration bewirkt wurden (vgl. Kapitel 3.1.1.).

Welche Ursache kann dieser Affinitätsverminderung zugrunde liegen?

Die Oxidation von SH-Gruppen durch NAD kommt nicht in Betracht, weil das dabei entstehende reduzierte Pyridinnucleotid durch seinen reaktivierenden und affinitätserhöhenden Einfluß einen ausgleichenden Effekt erzielen würde.

H_2-Sättigungskurven, in Gegenwart von 0,8 mM NAD aufgenommen, hatten einen Hill-Koeffizienten, der immer knapp über dem Wert

1 lag (n = 1,05-1,1). H_2-Sättigungskurven, in Gegenwart von 0,2 mM NAD aufgenommen, hatten dagegen einen Hill-Koeffizienten, der immer knapp unter dem Wert 1 lag (n = 0,9-0,95).
Zwar erscheint es nicht angebracht, angesichts dieser von 1 relativ geringfügig abweichenden Werte von Kooperativität zu sprechen, dennoch deutet die geringe, aber reproduzierbare zwischen 0,1 und 0,2 liegende Differenz der Koeffizienten an, daß sich die durch NAD-Konzentrationsveränderungen bedingten Affinitätsunterschiede auf Konformationseffekte gründen.

3.8.5. NAD- und H_2-Sättigung in Gegenwart von ATP und FMN

ATP und FMN, die sich als Aktivatoren der Hydrogenase erwiesen (Kapitel 3.7.), zeigten keinerlei Effektor-Wirkung im regulatorischen Sinn, d.h. sie übten keine heterotropen Effekte auf die Substratbindung aus. Einzeln und gemeinsam eingesetzt, sowohl beim oxidierten wie beim reduzierten Enzym beeinflußten sie immer nur die Aktivität, niemals die Affinität gegenüber den Substraten.

3.9. Wasserstoffacceptoren der Hydrogenase

3.9.1. Reduktion physiologischer und künstlicher H-Acceptoren in Gegenwart von NAD(H)

PFITZNER et al. (1970) fanden, daß FMN, FAD und MB durch die Hydrogenase von H16 lediglich in Gegenwart katalytischer Mengen NAD reduziert werden und folgerten daraus, daß NAD alleiniger H-Acceptor der Hydrogenase ist, die Reduktionen der anderen Verbindungen dagegen von der NAD-Reduktion abhängige Sekundärreaktionen darstellen.
Um diese Aussage zu überprüfen, wurde ein weites Spektrum physiologischer Elektronenüberträger, künstlicher Farbstoffe und

Redoxverbindungen auf deren Fähigkeit hin, als H-Acceptor der Hydrogenase zu fungieren, getestet und die Aktivität des Enzyms in Abwesenheit und Gegenwart von 5 µM NAD(H) manometrisch und z.T. auch vergleichsweise photometrisch bestimmt.
In Abwesenheit von NAD(H) reagierte die Hydrogenase nicht mit einem einzigen der insgesamt 15 eingesetzten Wasserstoffacceptoren. Es genügte jedoch die Gegenwart geringster Mengen NAD(H), um die Reduktion der in Tabelle 9 aufgeführten Verbindungen mit maximaler Rate ablaufen zu lassen. Entgegen der Angabe von PFITZNER et al. (1970) reduzierte die Hydrogenase auch molekularen Sauerstoff. Die Knallgasreaktion war trotz ihrer geringen spezifischen Rate gut registrierbar, wenn die Enzymkonzentration auf das zehnfache erhöht wurde.
Nicht reduziert wurden lediglich NADP und Ferredoxin aus C. pasteurianum.
Spektakulär und obiger These zuwiderlaufend, war der Befund, daß mit einem Teil der Acceptoren eine wesentlich höhere Aktivität erzielt wurde als mit NAD selbst. Die H_2-Aufnahmerate mit Menadion* war dreifach, mit PMS und DCPIP bis vierfach und mit Ferricyanid sogar fünffach höher als mit NAD. Pro Std und mg Protein wurden in Gegenwart von Ferricyanid (5 µmole in 2,2 ml) bis zu 350 000 µl H_2 aufgenommen.
Aus diesen Ergebnissen, die auf der Basis der von PACKER und VISHNIAC (1955) aufgestellten und von PFITZNER et al. (1970) bestätigten These nicht zu erklären sind, wurde folgende neue These abgeleitet: Die Reduktion der von NAD verschiedenen H-Acceptoren ist keine Sekundärreaktion, der die NAD-Reduktion als Primärschritt vorausgeht, sondern die Hydrogenase wird mit

---

* Die Aktivitätswerte, die in Gegenwart von Menadion und Ubichinon erzielt wurden, sind in der Tabelle in Klammern angegeben, weil sie nicht auf exakter Bestimmung, sondern auf relativ grober Kalkulation basieren: Bis zum Reaktionsstart verdunstete ein Teil des Acetons, was einerseits zu einer manometrisch zu beobachtenden Gasentwicklung führte und andererseits dazu, daß ein Teil der Substrate wieder ausfiel. Mit Hilfe eines Kontrollansatzes, der keine H-Acceptoren, aber die gleiche Konzentration Aceton enthielt, ließen sich die H_2-Aufnahmeraten kalkulieren.

Tab. 9: Reduktion von Wasserstoffacceptoren

H-Acceptor	Redoxpotential E'o (V)	% Aktivität	
		Abwesenheit von 5 µM NADH	Gegenwart von 5 µM NADH
MV	-0,440	0	70
Ferredoxin	-0,420	0	0
BV	-0,359	0	34
NADP	-0,320	0	0
NAD	-0,320	100	40
Janusgrün	-0,225	0	108
FAD	-0,214	0	77
FMN	-0,208	0	85
Menadion	-0,044	0	(307)
Ubichinon	-0,005	0	(85)
MB	+0,011	0	125
PMS	+0,080	0	354
DCPIP	+0,204	0	385
Cytochrom c	+0,250	0	35
Ferricyanid	+0,429	0	503
O_2	+0,810	0	2

Zweiarmige Warburggefäße enthielten in 2,2 ml: Hauptraum: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) und je nach Reaktionsgeschwindigkeit 5-100 µg Protein. 1. Seitenarm: 11 mµmole NADH. 2. Seitenarm: 5 (0,5) µmole H-Acceptor. Von Cytochrom c und Ferredoxin wurden 0,5 µmole, von allen anderen H-Acceptoren 5 µmole eingesetzt. NADH und H-Acceptoren waren jeweils in Pufferlösung aufgenommen worden, mit Ausnahme von Ubichinon und Menadion, die sich allein in Aceton lösen ließen. Die Warburggefäße wurden 20 min mit H_2 (zur Messung der Knallgasreaktion enthielt die Gasphase 10% O_2) durchspült und anschließend weitere 10 min geschüttelt, ehe die NADH-Lösung aus dem ersten Seitenarm in den Hauptraum gekippt wurde. Nach zweiminütiger Inkubation wurde die H-Acceptorlösung aus dem zweiten Seitenarm gekippt und die Reaktion gestartet. Inkubationstemperatur: 30°C. 100% Aktivität entspricht der H_2-Aufnahmerate, die mit NAD als H-Acceptor in Abwesenheit von NADH erreicht wurde (67 000 µl/Std·mg Protein).

Hilfe von NADH von einer inaktiven in eine aktive Enzymform überführt, die mit den H-Acceptoren direkt und mit einigen Verbindungen sogar wesentlich schneller reagiert als mit NAD. Das bedeutet, daß diese Reduktionen ebenfalls als eigenständige und als von der NAD-Reduktion unabhängige Primärreaktionen anzusehen sind.

Zieht man die bekannten und in den entsprechenden Kapiteln bereits geschilderten Wirkungen von NADH in Betracht (Reaktivierung des Enzyms; Affinitätserhöhung gegenüber den Substraten), so erscheint diese These einleuchtend. Wird das Enzym unter Luft angereichert und aufbewahrt, so liegt es in seiner oxidierten, nicht reaktionsfähigen Form vor, d.h. es ist nicht nur inaktiv gegenüber den von NAD verschiedenen H-Acceptoren, sondern es ist ebenso inaktiv gegenüber NAD. Aufgrund eines anzunehmenden Gleichgewichts zwischen aktivem und inaktivem Enzym jedoch, sind immer auch wenige aktive Moleküle zugegen, die mit den Substratmolekülen reagieren können. Im Falle von NAD führt das zur Produktion weniger Moleküle NADH, die ausreichen, die Hydrogenase zu reaktivieren. Werden aber andere, von NAD verschiedene H-Acceptoren eingesetzt, so wird kein NADH gebildet, und die wenigen vorhandenen reduzierten H-Acceptor-Moleküle können nicht, zumindest nicht in derart geringer Konzentration, die Funktion des NADH erfüllen: Die Reaktion läuft nicht ab.

Aus all diesen Vorstellungen ergibt sich zwingend, daß für die Reduktion der von NAD verschiedenen H-Acceptoren nicht, wie bisher angenommen, NAD benötigt wird, sondern daß die entscheidende Rolle das reduzierte Pyridinnucleotid spielt.

Daß NAD auch bei der Enzymreaktivierung unbeteiligt ist und sogar die inaktive Enzymform begünstigt, wurde bereits in Kapitel 3.1.1. beschrieben.

3.9.2. Versuche zum Nachweis der Fähigkeit der Hydrogenase, mit einer Vielzahl von H-Acceptoren direkt reagieren zu können

Die im vorangegangenen Kapitel formulierte These konnte anhand folgender Untersuchungsergebnisse untermauert und nachgewiesen werden:

1. Wurde die Enzymlösung vor dem Reaktionsstart in Gegenwart von 5 µM NADH bei 30°C unter Schütteln 2 min vorinkubiert, so führte das zu einem Verlust der NAD - reduzierenden Aktivität von 60%, d.h. daß nach solchen Vorbehandlungsbedingungen nicht nur mit Menadion, DCPIP, PMS und FC eine höhere Aktivität erzielt wurde, sondern auch mit fast allen anderen Redoxverbindungen (vgl. Tabelle 9).
   Befand sich das NAD von Anfang an zusammen mit dem Enzym im Hauptraum des Warburggefäßes, so konnte nach der Begasungsprozedur und dem Kippen der NAD-Lösung in den Hauptraum keinerlei Wasserstoffaufnahme gemessen werden, d.h. das Enzym war gegenüber NAD völlig inaktiv geworden, dagegen blieb die Aktivität in Gegenwart der anderen H-Acceptoren unbeeinflußt. Da also die Zerstörung der NAD-reduzierenden Aktivität nicht auch gleichzeitig die Reduktion dieser Verbindungen unmöglich macht, sie nicht einmal begrenzt, kann die NAD-Reduktion auch nicht als Primärschritt vorausgehen. Vielmehr handelt es sich tatsächlich um völlig voneinander unabhängige Reaktionsabläufe.
   Was bedeutet dieses Ergebnis im einzelnen? Die Hydrogenase besitzt eine Bindungsstelle, die allein für NAD spezifisch ist. Die durch Einwirkung von NADH und anderer reduzierender Bedingungen hervorgerufene Denaturierung des Enzyms führt zu einer Veränderung der Bindungsstelle, die die Bindung und Umsetzung von NAD verhindert. Von der Instabilität durch Reduktion sind weder das H_2-aktivierende Zentrum noch die offensichtlich unspezifischen Bindungsstellen für die von NAD verschiedenen H-Acceptoren betroffen.
2. Mit Hilfe unphysiologischer Bedingungen, a) dem Zusatz ge-

ringer Mengen Dithionit (1 µmol) und b) dem Bestrahlen (2 Std) des Enzyms mit UV-Licht (366 nm), wurde die Hydrogenase ebenfalls in den reduzierten und aktiven Zustand versetzt, der die Reduktion von Farbstoffen und anderen Redoxverbindungen auch in völliger Abwesenheit von NAD und NADH ermöglichte.

3. Der letzte und endgültige Nachweis sollte mit Hilfe des Einsatzes von NAD(H)-Strukturanalogen erbracht werden. Es galt, eine NAD-strukturanaloge Verbindung ausfindig zu machen, die nicht reduziert wird, deren reduzierte Form andererseits die Hydrogenase wie NADH in die aktive Enzymform zu überführen vermag. NADP(H), nicht künstlich synthetisiert, aber NAD(H)-strukturanalog, erfüllte beide dieser Forderungen: Die Unfähigkeit der Hydrogenase, mit NADP zu reagieren, wurde bereits im vorangegangenen Kapitel erwähnt (siehe auch Tabelle 9 und Abbildung 27). Als Zeichen für das Vermögen von NADPH, die Hydrogenase reaktivieren zu können, wurde die vollständige Aufhebung der NAD-Reduktionsanlaufphase in Gegenwart von 0,4 mM dieser Verbindung gewertet, die sich somit für die Untersuchungen, deren Ergebnisse im folgenden zusammengefaßt werden, als geeignet anbot.
In Gegenwart katalytischer Mengen (0,025 mM) NADPH vermochte die Hydrogenase tatsächlich alle eingesetzten Wasserstoffacceptoren (FAD, FMN, Cytochrom c, MV, MB, PMS, DCPIP und FC) zu reduzieren. Die Reaktionen liefen vollständig ab, lediglich die Raten, die mit dem NADPH-aktivierten Enzym erzielt wurden, waren um etwa 20-30% verringert (siehe Abbildung 27). Die Aktivität wurde manometrisch als H_2-Aufnahme bestimmt. Die Reduktion von MB, DCPIP (660 nm), FC (405 nm) und Cytochrom c (550 nm) wurde vergleichend auch photometrisch gemessen. Kontrollen (Messung von Reaktionsraten in Abwesenheit des Enzyms bzw. von molekularem Wasserstoff) sicherten die Ergebnisse ab.
Da aufgrund der Unfähigkeit der Hydrogenase, NADP zu reduzieren, sichergestellt ist, daß nach einer eventuell doch stattfindenden Übertragung des NADPH-Wasserstoffs auf das Substrat,

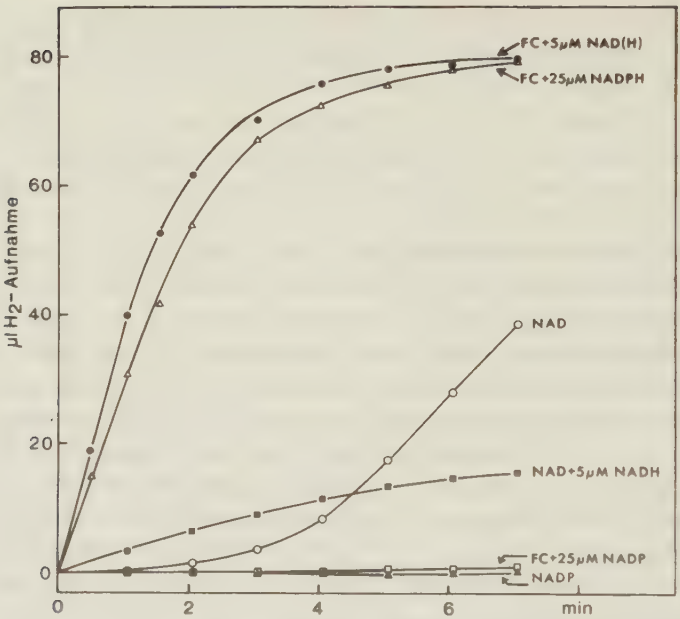


Abb. 27: Ferricyanid-Reduktion in Gegenwart von NAD(H) und NADP(H)

Die Reaktionsbedingungen waren den Angaben unter Tab. 9 entsprechend, es wurden lediglich statt 5 µmole Ferricyanid 10 µmole und neben NADH in getrennten Ansätzen auch katalytische Mengen NAD und NADP(H) eingesetzt.

NADPH nicht regeneriert werden kann, sind diese Ergebnisse ein sicherer Beweis dafür, daß der während des Versuchs aufgenommene molekulare Wasserstoff, unabhängig von einer vorausgehenden Primärreaktion und ohne Vermittlung durch einen Zwischenüberträger wie NAD, vom Enzym direkt auf den jeweiligen H-Acceptor übertragen wird.
Die einzelnen Reaktionskinetiken in Gegenwart und Abwesenheit der verschiedenen oxidierten und reduzierten Pyridinnucleotide sind am Beispiel der FC-Reduktion in Abbildung 27 dargestellt.

Eine zweite eingesetzte NAD-strukturanaloge Verbindung, Acetylpyridin-adenin-dinucleotid (APAD), erwies sich für die hier vorgesehenen Versuchszwecke als untauglich, weil sie durch die Hydrogenase, wenn auch mit erheblich verminderter Aktivität (relative Aktivität gegenüber der NAD-Reduktion: 9%) reduziert werden konnte.

3.9.3. Nachweis einer Diaphoraseaktivität mit dem Präparat der hochgereinigten Hydrogenase

Diaphoraseaktivität ist die Befähigung zur Reduktion von Wasserstoff- und Elektronenacceptoren mit Hilfe von NAD(P)H als entsprechendem Donator. Dieser Reaktion liegt also keine H_2-Aufnahme und damit auch keine hydrogenaseabhängige Aktivierung von molekularem Wasserstoff zugrunde. Dennoch konnte mit dem Extrakt des hochgereinigten Enzyms unabhängig von der Hydrogenaseaktivität auch eine Diaphoraseaktivität, sowohl mit NADH als auch mit NADPH als Substrat, nachgewiesen werden. MV, MB, DCPIP, FC und Cytochrom c konnten erfolgreich als Oxidanten eingesetzt werden. Die Beobachtung, daß in Gegenwart der Enzymlösung NAD(P)H sogar mit Sauerstoff oxidiert wurde, bedeutete, daß das Hydrogenasepräparat auch NAD(P)H-Oxidase-Aktivität besaß.
Die Aktivitäten der Diaphorase wurden photometrisch bestimmt (vgl. "Methoden").
Zwischen Hydrogenase-und Diaphoraseaktivität bzw. zwischen zwei eigenständigen, voneinander unabhängigen Reduktionsaktivitäten konnte leicht differenziert werden: Zur Reduktion von H-Acceptoren verwertete die Hydrogenase H_2, die Diaphorase aber NAD(P)H als H-Donator. Zwar wurde dem Hydrogenaseansatz zur Reaktivierung des Enzyms ebenfalls NADH zugesetzt, die Konzentration war aber derart gering (5 μM), daß es keinesfalls als Substrat fungieren konnte. Ein Kontrollansatz ohne H_2 wies nach, daß so geringe katalytische Mengen NADH keine registrierbare Reaktion verursachten.

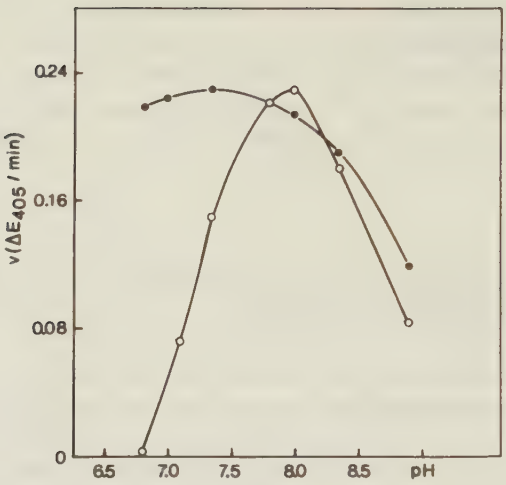


Abb. 28: pH-Optimum der hydrogenase- und diaphoraseabhängigen Ferricyanid-Reduktase-Aktivität

Hydrogenase-Reaktionsansatz (3 ml): 50 mM Tris-HCl-Puffer (H_2-gesättigt); 0,6 mM Ferricyanid; 0,005 mM NADH; 5,5 µg Protein. Diaphorase-Reaktionsansatz (3 ml): 50 mM Tris-HCl-Puffer (N_2-gesättigt); 0,6 mM Ferricyanid; 0,6 mM NADH; 5,5 µg Protein. Der pH-Wert beider Ansätze wurde wie in der Abb. angegeben variiert. Inkubationstemperatur: 30°C.

● Diaphoraseabhängige FC-Reduktase-Aktivität

o Hydrogenaseabhängige FC-Reduktase-Aktivität

Deutlich unterschieden sich Hydrogenase und Diaphorase in ihrer pH-Anhängigkeit, wenn FC als Substrat eingesetzt wurde. Dem deutlichen pH-Optimum der Hydrogenaseaktivität bei pH 8,0, das auch für die hydrogenaseabhängige FC-Reduktase bestätigt werden konnte, stand das schwach ausgeprägte Optimum der Diaphoraseaktivität (FC-Reduktase) um 7,35 gegenüber (Abbildung 28).

Folgende Indizien sprachen dafür, daß die Diaphoraseaktivität

nicht auf eine verunreinigende Proteinkomponente in der Enzympräparation zurückzuführen war, sondern tatsächlich zur Hydrogenase gehörte:

1. Die Diaphoraseaktivität (FC-Reduktion) wurde während der Enzymanreicherung parallel zur NAD-Reduktion verfolgt. Nach der Ammoniumsulfatfraktionierung befanden sich im Proteinextrakt noch drei Enzyme, die Diaphoraseaktivität aufwiesen. Sie ließen sich mit Hilfe von DEAE-Cellulose-Säulen-Chromatographie in drei peaks auftrennen (siehe Abbildung 11). Das Aktivitätsprofil des am stärksten auftretenden peaks war dem Profil der Hydrogenaseaktivität analog. Aktivitätsmaxima der Diaphorase und der Hydrogenase stimmten miteinander überein. Diese Identität konnte nach jedem Anreicherungsschritt demonstriert werden und trat auch nach der abschließenden Chromatographie an Hydroxylapatit auf (Abbildung 13). Wieder erschien die höchste katalytische Wirksamkeit beider Reaktionssysteme in ein und derselben Fraktion.
   Das Verhältnis NAD-reduzierender Hydrogenaseaktivität und FC-reduzierender Diaphoraseaktivität blieb vom ersten DEAE-Cellulose- bis zum letzten Reinigungsschritt nahezu konstant (E_{365}/min: E_{405}/min = 1,4-1,6), d.h. die Diaphoraseaktivität ließ sich während der Anreicherung nicht ausverdünnen, sondern war in dem als elektrophoretisch homogen charakterisierten Hydrogenasepräparat noch in demselben Maße vorhanden wie im unreinen Enzymextrakt.
2. Die eingesetzten H-Acceptoren wurden mit NAD(P)H größenordnungsmäßig mit der gleichen Rate reduziert wie mit H_2 als Reduktanten. Am schnellsten wurde in beiden Fällen FC reduziert. Die Umsatzrate, photometrisch bei 405 nm gemessen, betrug, bezogen auf den Rohextrakt (lösliche Fraktion), 2 400 Einheiten und, bezogen auf das reine Enzym, 162 000 Einheiten pro g Protein.
   Die relative Sauerstoff-Reduktionsrate lag (im Vergleich zur NAD-Reduktionsrate) mit beiden H-Donatoren bei etwa 2%, das entsprach einer Aktivität von, bezogen auf den Rohextrakt,

16 Einheiten und, bezogen auf das reine Enzym, 1100 Einheiten pro g Protein. Die NAD(P)H-Oxidase-Aktivität wurde als NAD(P)H-Abnahme bei 365 nm gemessen (P_{N_2} = 90%; P_{O_2} = 10%). Die wesentlich geringere Rate der NADH-Oxidase-Reaktion, die unter streng anaeroben Bedingungen ablief (Reversion der NAD-Reaktion!) wurde von der Gesamtrate abgezogen.
Die Identität bzw. das nahezu identische Ausmaß der Raten der hydrogenase- und diaphoraseabhängigen Reaktionen ist sicher nicht auf Zufall zurückzuführen, sondern eher als wichtiger Hinweis dafür zu werten, daß 1. nicht die NAD(P)H-Bindung (diaphoraseabhängige Reaktion) und nicht die H_2-Aktivierung (hydrogenaseabhängige Reaktion), sondern die Übertragung des Wasserstoffs auf die Acceptoren geschwindigkeitsbestimmender Reaktionsschritt beider Reaktionen ist, und daß 2. diese Wasserstoffübertragung auch bei beiden Reaktionen nach demselben Mechanismus am selben Enzym abläuft.

3. Mit FC als Substrat wurden Substratsättigungskurven aufgenommen, einmal in Gegenwart sättigender H_2-Konzentration und im anderen Fall in Gegenwart sättigender NADH-Konzentration (Abbildung 29). Mit Hilfe der Auftragung der Meßwerte nach Lineweaver-Burk (Abbildung 29b) konnten K_m-Werte bestimmt werden, die für die Hydrogenase und die Diaphorase mit 0,2 mM exakt identisch waren. Dieses Ergebnis ist als ebensowenig zufällig anzusehen wie die Identität der Reaktionsraten, es weist vielmehr nach, daß für das Ferricyanid nur eine Bindungsstelle existiert, deren Affinität gegenüber dem Substrat unverändert bleibt, gleich welcher Reduktant als H-Donator fungiert. Da die Existenz nur einer Bindungsstelle gleichbedeutend ist mit der Existenz nur eines Enzyms, ist die mögliche Folgerung: Allein die Hydrogenase ist das für die Diaphoraseaktivität verantwortliche Enzym.

Der für NADH ermittelte Km-Wert von 0,08 mM (Abbildung 30) offenbarte, daß die Hydrogenase gegenüber dem reduzierten Pyridinnucleotid eine wesentlich höhere Affinität besaß als gegenüber

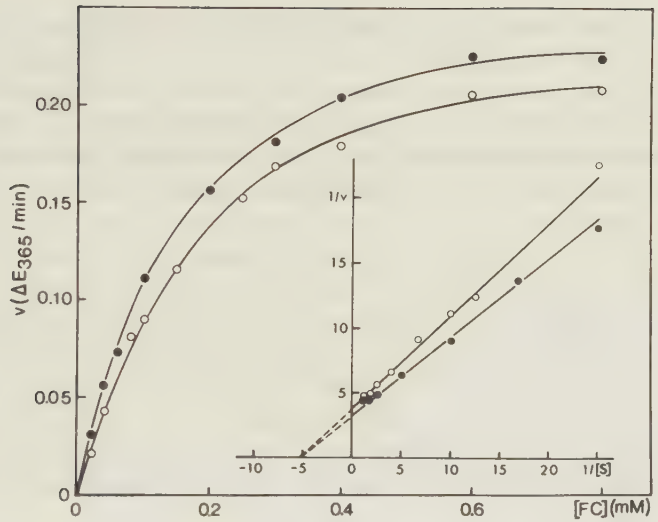


Abb. 29: Abhängigkeit der Hydrogenase- und Diaphoraseaktivität von der Ferricyanid-Konzentration

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0); 5,5 µg Protein; die FC-Konzentration variierte wie in der Abbildung angegeben. Die sättigenden Konzentrationen der Zweitsubstrate H_2 (Hydrogenase) und NADH (Diaphorase) betrugen jeweils 0,6 mM. Inkubationstemperatur: 30°C.

● Hydrogenase; ○ Diaphorase

NAD, von dem eine siebenmal so hohe Konzentration aufgewendet werden mußte, um halbmaximale Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen.

Während das Enzym mit NADP gar nicht reagierte, war die Affinität gegenüber NADPH sehr gering (K_m^{NADPH} = 6,4 mM). Durch den Einsatz entsprechend höherer Konzentrationen war es aber dennoch möglich, mit NADPH ebenso hohe Diaphoraseaktivitäten zu erreichen wie mit NADH.

Auch in Enzymlösungen, die angereicherte Hydrogenase von N. opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1974) bzw. von P.ruhlandii (BONE et al., 1963) enthielten, wurden Diaphorase (MB-Reduktase-)-Aktivitäten gefunden, die aber, möglicherweise aufgrund unzureichender Charakterisierung, nicht der Hydrogenase, sondern einem verunreinigenden Enzym zugeordnet wurden.

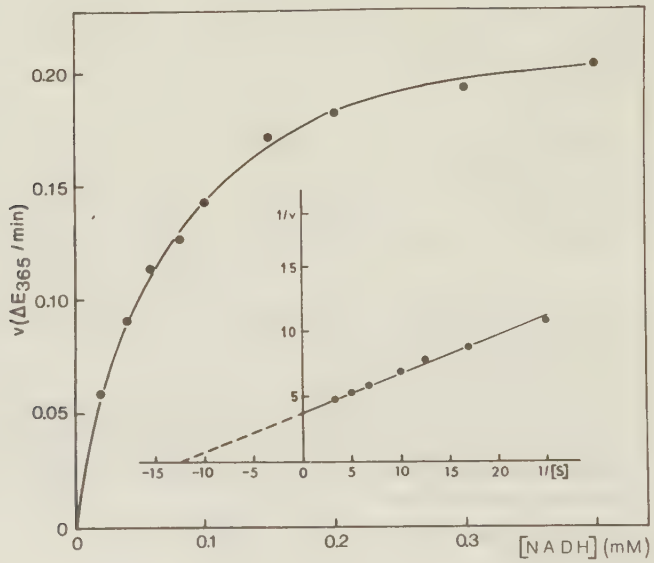


Abb. 30: Abhängigkeit der Ferricyanid-Reduktase-Aktivität von der NADH-Konzentration

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0); 0,6 mM FC; 5,5 µg Protein; die NADH-Konzentration wurde wie in der Abbildung angegeben variiert. Alle Lösungen wurden, bevor sie eingesetzt wurden, mit O_2-freiem N_2-Gas gesättigt. Inkubationstemperatur: 30°C.

3.10. Reversibilität der NAD-Reduktion und H_2-Entwicklung

Wasserstoffentwicklung ist bei anaeroben Bakterien weit verbreitet und von physiologischer Bedeutung (vgl. "Einleitung"). Gut untersucht und aufgeklärt ist die H_2-Entwicklung ferredoxinabhängiger Enzymsysteme. Sie repräsentiert hier den durch die Hydrogenase vermittelten letzten Schritt eines Elektronentransports, in dem H^+ gewissermaßen als terminaler Elektronenacceptor fungiert (MORTENSON und NAKOS, 1973). Während die Bildung von molekularem Wasserstoff aus reduziertem Ferredoxin thermodynamisch leicht vorstellbar ist, war die Frage, ob die als H_2-Dehydrogenasen bekannten löslichen Hydrogenasen der Wasserstoffbakterien dazu in der Lage sind, unter bestimmten Bedingungen eine H_2-Entwicklung aus NADH zu katalysieren und ob das Ausmaß dieser Reaktionen ausreicht, sie auch nachweisen zu können.

Mit der reinen Hydrogenase von H16 gelang es, eine H_2-Entwicklung, sowohl aus reduziertem MV und BV als auch aus NADH, manometrisch nachzuweisen.
Mit MV, das ein noch niedrigeres Redoxpotential hat als H_2 und Ferredoxin (vgl. Tabelle 9), wurde eine sehr hohe H_2-Produktionsrate (63 700 µl/Std·mg Protein) erzielt, die größenordnungsmäßig der NAD-Reduktionsrate entsprach und die die Rate der H_2-Aufnahme, wenn MV als Acceptor vorlag, sogar um 20% übertraf (Tabelle 10).
Da die Gegenwart von Dithionit ausreichende Gewähr dafür bot, daß das Enzym in der reaktivierten Form vorlag, war es erwartungsgemäß, daß die Reaktionen der Wasserstoffentwicklung aus MV_{red} und BV_{red} auch ohne Gegenwart von Pyridinnucleotiden ohne Anlaufphase sofort mit maximaler Rate starteten.
Die Bildung von molekularem Wasserstoff aus NADH machte etwa 1/300 der Hinreaktion aus und war auch bei Einsatz relativ großer Enzymmengen (50-100 µg) manometrisch und auch photometrisch (vgl. Kapitel 3.9.3.) nur schwach nachweisbar. Nach Zusatz von Dithionit in den Reaktionsansatz jedoch und der damit verbun-

Tab. 10: H_2-Entwicklung aus Methylviologen, Benzylviologen und NADH

Gemessene Reaktion	Substrat	Gegenwart von Dithionit	spez.Reaktionsrate (µl/Std·mg Protein)	relative Aktivität (%)
H_2-Aufnahme	NAD	-	67 000	100
H_2-Aufnahme	MV_{ox}	-	46 900	70
H_2-Produktion	MV_{red}	+	63 700	95
H_2-Produktion	BV_{red}	+	26 800	40
H_2-Produktion	NADH	+	1 610	2,41
H_2-Produktion	NADH	-	220	0,33
H_2-Produktion	Dithionit	+	127	0,19
H_2-Produktion (ohne Enzym)	NADH	+	0	0
H_2-Produktion	Ferredoxin$_{red}$	+	0	0

Die Messungen der H_2-Aufnahme wurden wie unter Tab. 9 beschrieben durchgeführt. Für die Bestimmung der H_2-Produktionsraten wurden zweiarmige Warburggefäße verwendet. Sie enthielten in 2,2 ml Flüssigkeitsvolumen: Hauptraum: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0); 10 (100) µg Protein. 1. Seitenarm: 2 mg Dithionit 2. Seitenarm: 5 µmole Substrat. Beide Seitenarme wurden vor Meßbeginn unmittelbar hintereinander in den Hauptraum gekippt. Atmosphäre: 100% N_2.

denen Schaffung erhöhter reduzierender Bedingungen, konnte eine deutliche Gasentwicklung verfolgt werden, deren Rate immerhin 1/40 (2,4%) der NAD-Reduktionsrate betrug.

ATP-Zusatz und die Gegenwart eines NADH-regenerierenden Systems (Glucose-6-phosphat und Glucose-6-phosphat-DH) vermochten die H_2-Entwicklung nicht zu beeinflussen.

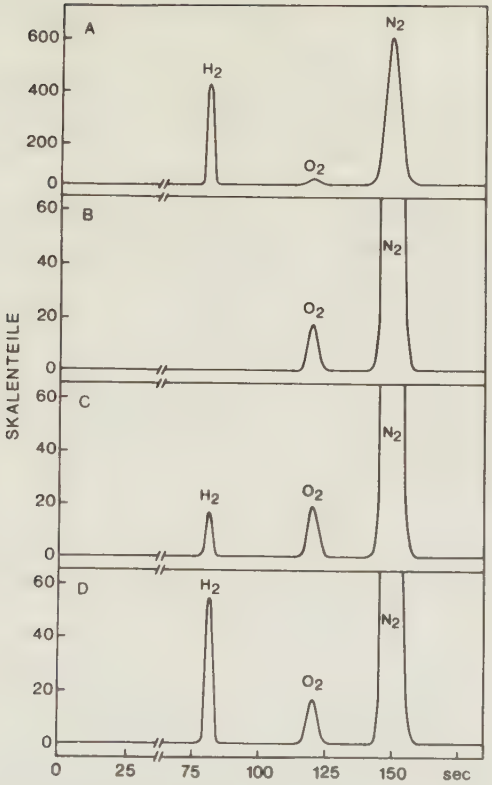


Abb. 31: Gaschromatographischer Nachweis der H_2-Entwicklung

Die H_2-Entwicklung fand in mit Gummistopfen verschlossenen Warburggefäßen statt, die über zwei Spritzkanülen mit Stickstoff begast worden waren. Der Reaktionsansatz war den Angaben unter Tab. 10 entsprechend. Nach 15 min (MV enthaltendes Gefäß) bzw. nach 90 min (NADH enthaltendes Gefäß und Gefäß ohne H-Donator) wurden Gasproben entnommen und in den Gaschromatographen eingespritzt.

A: vorgegebenes Gasgemisch: H_2 = 2,5%; N_2 = 97,5%

B: Kontrollen: ohne H-Donator oder ohne Enzym

C: H-Donator: NADH

D: H-Donator: MV_{red}

Aus reduziertem Ferredoxin wurde kein Wasserstoff entwickelt.

Um sicherzustellen, daß es sich bei der manometrisch erfaßten Gasentwicklung auch tatsächlich um produziertes H_2-Gas handelte, war es notwendig, den molekularen Wasserstoff als solchen zu identifizieren, ihn qualitativ nachzuweisen.
Dieser Nachweis konnte mittels zweier Methoden geführt werden:

1. Palladium zeichnet sich durch das spezifische Vermögen aus, H_2 zu absorbieren. Wurden in Parallelansätzen je 0,1 g von 10% Palladiumasbest in die Zentralzylinder der Warburggefäße gefüllt, so war weder in Gegenwart von reduziertem MV oder BV, noch in Gegenwart von NADH eine Gasentwicklung meßbar.
2. Den Warburggefäßen wurden Gasproben entnommen, die mit Hilfe eines Gaschromatographen qualitativ analysiert wurden. Die Analse wies eindeutig nach, daß in den Gefäßen, die Enzym und einen H-Donator (MV oder NADH) enthielten, eine H_2-Entwicklung stattfand (Abbildung 31). In den Gefäßen, denen ein H-Donator oder das Enzym fehlten, war auch nicht eine Spur von H_2-Gas zu finden.

3.11. Spektrale Eigenschaften der Hydrogenase

Die Gelbfärbung der gereinigten Hydrogenase ließ auf den Gehalt an Eisen oder Flavin schließen. Mit Hilfe spektrophotometrischer Messungen sollte zu ermitteln versucht werden, ob eine der beiden oder gar beide Cofaktoren Bestandteile der Hydrogenase sind.

3.11.1. Absorptionsspektrum des oxidierten und reduzierten Enzyms

Das Absorptionsprofil der oxidierten, unter Luft aufbewahrten und unvorbehandelten Hydrogenase (Abbildung 32) ließ sich fol-

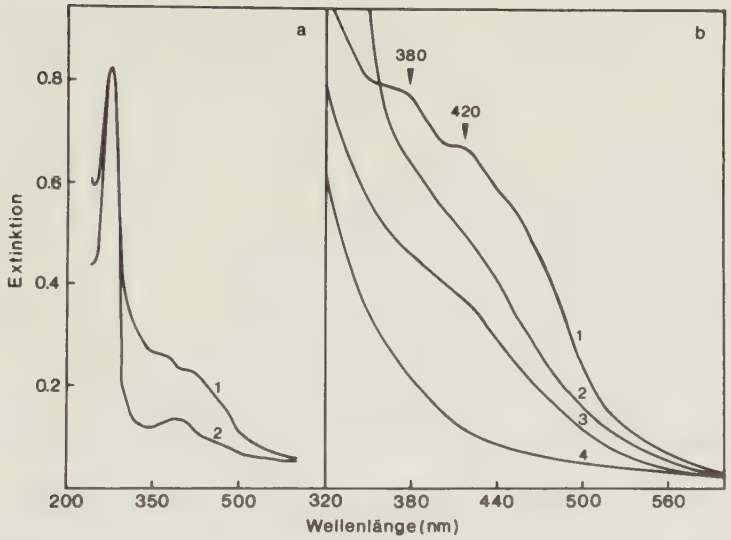


Abb. 32: Absorptionsspektren der Hydrogenase

Für die Messungen, durchgeführt in einem Zeiss-Spektralphotometer DMR 21, wurden 0,5 ml-Quarzküvetten (d = 1cm) verwendet. Das Enzym war in 50 mM KP-Puffer (pH 7,0) gelöst, der Leerwert, gegen den gemessen wurde, enthielt denselben Puffer. Die Proteinkonzentration betrug 0,6 mg/ml (a) bzw. 2,1 mg/ml (b). Die Spektren des oxidierten Enzyms wurden unter Luft aufgenommen, die reduzierten anaerob unter Wasserstoff oder im Fall der Dithionitreduktion unter Stickstoff.

a: 1 = Reines Enzym (oxidierter Zustand)
2 = Verunreinigtes Enzym (DEAE-Extrakt aus Anreicherungsschritt bei pH 8,2; oxidierter Zustand)

b: 1 = Unvorbehandeltes, oxidiertes Enzym
2 = Reduziertes Enzym: Die Reduktion erfolgte direkt in der Küvette durch Zugabe eines leichten Überschusses an festem Dithionit
3 = Reduziertes Enzym: Die Hydrogenaselösung wurde über Nacht bei 4°C unter H_2 und in Gegenwart von 5 µM NADH aufbewahrt.
4 = Reduziertes Enzym: Die Hydrogenaselösung wurde über Nacht bei 4°C unter H_2 einer UV-Bestrahlung (366 nm) ausgesetzt.

gendermaßen beschreiben: Die Absorptionskurve stieg vom Startpunkt der Messung (600 nm) sofort an, erfuhr im Bereich um 500 nm einen steilen Anstieg und bildete bei 420 und 380 nm zwei schwach ausgeprägte, als Schultern in Erscheinung tretende Maxima aus. Die Kurve ging dann direkt über in den Proteinabsorptionspeak, der bei 276 nm sein Maximum hatte.
Das Spektrum insgesamt war gekennzeichnet 1. durch eine starke Absorption, die sich über den gesamten in der Abbildung 32 wiedergegebenen, sichtbaren Wellenlängenbereich erstreckte und in Richtung niederer Wellenlängen anstieg und 2. durch das Fehlen signifikanter peaks.
Genau dieses Absorptionsverhalten kann als charakteristisch für Proteine bezeichnet werden, die nichthämgebundenes Eisen enthalten. Anders als Hämproteine, deren Spektren scharfe Absorptionsbanden um 550, 520 und mit besonders signifikanter Intensität bei 420 nm aufweisen können, zeichnen sie sich durch eine breite, ausgedehnte Absorption aus, die bis auf Ausnahmen charakterisiert ist durch ihren vom langwelligen bis hin zum kurzwelligen Bereich stattfindenden kontinuierlichen Anstieg, der lediglich durch Ausbildung von Schultern oder von mehr oder weniger deutlichen Maxima unterbrochen sein kann. Es gibt zwar auch bestimmte Wellenlängenbereiche (300-330, 375-390, 414-420 und 455-470 nm), in denen nonheme iron-Proteine und im besonderen ihre größte Gruppe, die Eisen-Schwefel-Proteine, bevorzugt absorbieren, auch ist das Erscheinungsbild ihrer Spektren insgesamt sehr ähnlich, dennoch können auftretende Maxima individuell sehr verschoben oder nur sehr schwach ausgeprägt sein, oder sie können sogar ganz fehlen. So tritt z.B. im Spektrum von Molybdoferredoxin, einer Komponente der Nitrogenase (C.pasteurianum), trotz beträchtlicher Absorption in der Eisen-Schwefel-Chromophor-Region keine sichtbare Bande in Erscheinung (DALTON et al., 1971). Auch die Hydrogenase von C.pasteurianum, als Fe-S-Enzym identifiziert und beschrieben, weist in ihrem Absorptionsspektrum kein definitives Maximum auf (CHEN und MORTENSON, 1974). Das Absorptionsprofil der Hydrogenase von Desulfovibris vulgaris, ebenfalls ein Eisenenzym vom

Ferredoxin-Typ, bildet lediglich bei 408 nm eine Schulter aus. Ein Absorptionspeak mit deutlich erkennbarem Maximum und Minimum fehlt auch hier (LEGALL et al., 1971).

Die Reduzierung der Hydrogenase von H16 mit H_2 in Gegenwart katalytischer Mengen NADH, mit Hilfe des Zusatzes von Dithionit oder durch UV-Bestrahlung führte zum Verschwinden der Banden bei 420 und 380 nm und zur Absorptionsverminderung insgesamt, die je nach Reduktionsmethode und erreichtem Reduktionsgrad unterschiedlich stark war (vgl. Abbildung 32b): Die Absorption bei 420 nm wurde durch Zusatz von Dithionit um 29%, durch zehnstündige Aufbewahrung unter H_2 (+5 µM NADH) um 48% und durch zehnstündige Bestrahlung mit UV (366 nm) in Gegenwart von H_2 um 88% vermindert.
LEGALL et al. (1971) erreichten bei der Hydrogenase von D.vulgaris durch Zusatz von Dithionit eine Reduzierung der Absorption um ca. 40%. Die Reduktion der Hydrogenase von C.pasteurianum hatte auf das Absorptionsspektrum nur sehr geringen Einfluß. Ein Überschuß an zugesetztem Dithionit führte lediglich zu einer 10%igen Absorptionsminderung (NAKOS und MORTENSON, 1971).
Begasung der H16-Hydrogenase mit H_2 und Aufbewahrung in Gegenwart von H_2 allein ohne NADH-Zusatz oder die Aufbewahrung des Enzyms in Gegenwart von 5 µM NADH in einer N_2-Atmosphäre, also in Abwesenheit von molekularem Wasserstoff, veränderten den Verlauf der Absorptionskurve nicht, setzten lediglich die Gesamtabsorption geringfügig (um 5%) herab.
Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Beobachtung, daß solche Vorbehandlungen des Enzyms weder zu einer erkennbaren Verkürzung der Reaktionsanlaufphase führten, noch zu einer Änderung der Farbintensität der Hydrogenaselösung.
Interessant war der Vergleich des Absorptionsspektrums der als homogen dargestellten Hydrogenase mit dem eines teilweise angereicherten Enzyms (Extrakt des zweiten DEAE-Cellulose-Schritts). Trotz der im DEAE-Extrakt noch vorhandenen und ebenfalls absorbierenden Verunreinigungen, nahm die Absorption im Wellenlängen-

bereich zwischen 300 und 600 nm mit zunehmendem Reinheitsgrad nicht ab, sondern sogar wesentlich zu (Abbildung 32a), was als deutliches Zeichen dafür zu werten war, daß diese Absorption tatsächlich hydrogenaseeigen und nicht auf noch anwesende Fremdproteine zurückzuführen war. Der Absorptionsanstieg während der letzten Anreicherungsschritte drückte sich zahlenmäßig besonders deutlich im kleiner werdenden Faktor des Verhältnisses Proteinabsorption:Eisenabsorption aus. Wurden z.B. jeweils die Absorptionen der Wellenlängen 276 und 380 nm zueinander ins Verhältnis gesetzt, so ergab sich für das verunreinigte Enzym der Faktor 6,1, für das reine Enzym der Faktor 3,1. Die Größe des Faktors kann somit indirekt als ein Maß für die Reinheit der Hydrogenase gelten: Je höher der Reinheitsgrad des Enzyms, desto stärker die Absorption und desto kleiner dieser Faktor.

PFITZNER et al. (1970) beschrieben in dem Absorptionsspektrum, das sie von der angereicherten H_2-DH von H16 aufgenommen hatten, zwei kleinere Banden bei 411 und 387 nm. Aus der graphischen Darstellung ihrer Arbeit läßt sich aus dem Verhältnis Proteinabsorptionsmaximum (272 nm) : Absorptionsmaximum bei 387 nm ein Faktor von etwa 10 kalkulieren. Dieser Wert spricht für die relative Unreinheit der Hydrogenase dieser Anreicherung.

3.11.2. Nachweis einer Flavinkomponente

PFITZNER et al. (1970) schlossen aus dem äußeren Erscheinungsbild des Absorptionsspektrums, daß die Hydrogenase kein Flavin gebunden hält. Die Entdeckung der der Hydrogenase zugeordneten Diaphoraseaktivität aber, die gemeinhin als Charakteristikum von Flavoproteinen bekannt ist, war Veranlassung, der Frage nachzugehen, ob die Hydrogenase neben Eisen auch noch eine Flavinkomponente enthält, deren charakteristisches Absorptionsprofil (stark ausgeprägte und breite peaks bei 373 und 445 nm (FMN) bzw. 375 und 450 nm (FAD)) durch die Eisenabsorption überdeckt wird und daher nicht in Erscheinung treten kann.

Ein eingehendes Studium der Literatur offenbarte, daß es mehrere als Ferroflavoproteine identifizierte Enzyme gibt, deren Absorptionsspektren dem Spektrum der Hydrogenase durchaus ähnlich sind. So berichteten RINGLER et al. (1963) von einem relativ nichtssagenden Spektrum der NADH-DH aus Rinderherz. Das Erscheinungsbild des Absorptionsspektrums, das lediglich um 410 nm ein schwaches Maximum aufwies, ließ die Flavinkomponente (FMN) des Enzyms aufgrund des hohen Eisengehaltes unerkannt. SINGER et al. (1957) beschrieben für die Succinat-DH (Rinderherz) ein Absorptionsspektrum, das ebenfalls keine Flavinpeaks, stattdessen kleinere Banden bei 420 und 460 nm und eine Schulter bei 550 nm enthielt. Das Verhältnis Eisengehalt: FAD-Gehalt des Enzyms betrug 4:1. Ähnliche Verhältnisse fanden ALEMAN et al. (1965) bei der Xanthin-DH aus Hühnerleber: Auch hier verhinderte der hohe Eisengehalt des Enzyms und der relativ dazu geringe FAD-Anteil die Ausprägung eines flavintypischen Spektrums.
Als letztes, aber besonders zu betonendes Beispiel sei die Formiat-DH von Pseudomonas oxalaticus genannt, ein FMN-haltiges Eisen-Schwefel-Protein, dessen Absorptionsspektrum mit dem der löslichen Hydrogenase von H16 nahezu identisch ist. Die Formiat-DH enthält nur ein FMN, aber 5-8 Atome Eisen (HÖPNER und TRAUTWEIN, 1972).

Ein für die Charakterisierung der Flavine wesentliches Merkmal ist ihre Fähigkeit, bei Wellenlängen um 530 nm zu fluoreszieren. Die Bindung der Flavine an komplexe Moleküle verhindert Fluoreszenz oder vermag sie zumindest stark zu beeinträchtigen. Dies erklärt, warum die meisten der Flavoproteine zu fluoreszieren nicht in der Lage sind, und warum die wenigen Enzyme, die dazu in der Lage sind, im Vergleich zu freien Flavinen nur schwache Fluoreszenz zeigen. Zu diesen Enzymen gehören z.B. die Thioredoxin-Reduktase von E.coli (MOORE et al., 1964) und die Glyoxylat-Carboligase desselben Organismus (GUPTA und VENNESLAND, 1964). Eine Ausnahme stellt die Lipoyl-DH dar,

die als einziges Flavoprotein stärker fluoresziert als ihre ungebundene Flavinkomponente (PALMER und MASSEY, 1968).
Auch die gereinigte Hydrogenase von H16 wurde Fluoreszenzmessungen unterzogen, in der Erwartung, möglicherweise konkrete Hinweise und Anhaltspunkte für die Flavinhaltigkeit des Enzyms zu erhalten. Zunächst wurde ein Fluoreszenz-Exzitationsspektrum aufgenommen, um die geeignete Anregungswellenlänge für die eigentliche Fluoreszenzmessung zu ermitteln. Dieses Spektrum, dargestellt in Abbildung 33a, Kurve 2, war nur in begrenztem Maße aufschlußreich. Das Exzitationsspektrum einer flavinhaltigen Verbindung, von der allein das Flavin fluoreszierende Eigenschaften besitzt, hätte dem Absorptionsspektrum eines Flavins ähneln müssen. Das war nicht der Fall. Eine immerhin mögliche Aussage aber war, daß die Hydrogenase die Fähigkeit zur Fluoreszenz besaß, daß das Enzymmolekül durch Licht eines weiten Wellenlängenbereichs (260-620 nm) angeregt wurde.
430 bis 460 nm ist der für die Anregung von Flavinen charakteristische Wellenlängenbereich. Um eine Überschneidung von Exzitations- und Flavinfluoreszenzpeak zu vermeiden, wurde die Aufnahme des Fluoreszenz-Emissionsspektrums bei einer Anregungswellenlänge von 430 nm vorgenommen. Die im Emissionsspektrum auftretende für Flavin charakteristische Fluoreszenz um 530 nm konnte bei genügend hoch eingestellter Empfindlichkeit des Meßgeräts (Hitachi Fluoreszenz-Spektrophotometer 204) als starke, breite Bande mit einem Maximum bei 526 nm nachgewiesen werden (Abbildung 33b, Kurven 2 und 3). Das Verschwinden der Bande nach Reduktion der Hydrogenase mit Dithionit (Abbildung 33b, Kurve 4) belegte stichhaltig, daß die gemessene Fluoreszenz tatsächlich durch proteingebundenes Flavin verursacht worden sein mußte.
Um für diese Aussage eine letzte Bestätigung zu erhalten, war es notwendig, eine Methode zu finden, die eine Unterscheidung zwischen Eisen- und Flavinabsorption ermöglichte. Es mußte versucht werden, entweder die eventuell existierende Bindung des Eisens an labilen Schwefel etwa durch Einwirkung organi-

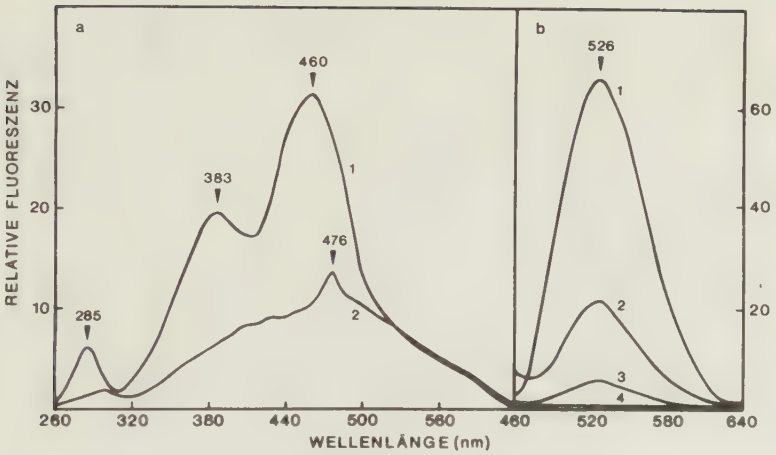


Abb. 33: Fluoreszenzspektren der Hydrogenase und des extrahierten Flavins

Die Fluoreszenz der in 50 mM KP-Puffer (pH 7,0) gelösten Hydrogenase und des TCA-Extrakts wurde in einem Hitachi-Fluoreszenz-Spektrophotometer 204 gemessen. Die Proteinkonzentration der Hydrogenaselösung betrug 1,2 mg/ml. Für die Messungen wurden zylindrische 0,5 ml-Küvetten verwendet. Die Meßmethode zur Aufnahme von Exzitations- und Emissionsspektren wurde der Hitachi-Arbeitsanleitung entnommen.

a: Fluoreszenz-Exzitationsspektren
   1 = Extrahiertes, freies Flavin
   2 = Native Hydrogenase

b: Fluoreszenz-Emissionsspektren
   1 = Extrahiertes, freies Flavin; Empfindlichkeitsstufe "9"
   2 = Native Hydrogenase; vierfach erhöhte Empfindlichkeit (Stufe "11")
   3 = Native Hydrogenase; Empfindlichkeitsstufe "9"
   4 = Reduzierte Hydrogenase (Zugabe eines Überschusses an Dithionit)

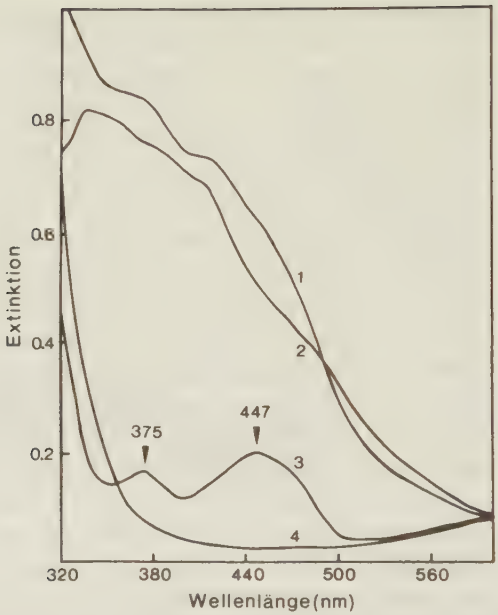


Abb. 34: Absorptionsspektrum des Trichloressigsäure-Extrakts

Die TCA-Fällung des Enzyms wurde wie unter "Methoden" beschrieben durchgeführt. Die Meßbedingungen waren den Angaben unter Abb. 32 entsprechend.

1 = Native Hydrogenase
2 = Differenz der Spektren 1 und 3
3 = TCA-Extrakt (freies Flavin)
4 = Dithionit-reduzierter TCA-Extrakt

scher Quecksilberverbindungen zu lösen und damit die Eisenabsorption aufzuheben, oder das gebundene Flavin zu isolieren, d.h. mit Hilfe von Proteinfällungsmethoden aus dem Enzym zu extrahieren. Letzteres gelang durch Behandlung der Hydrogenase mit 20%iger Trichloressigsäure (TCA)-Lösung (vgl. "Methoden").

Der mit 4 M K_2HPO_4-Lösung neutralisierte TCA-Extrakt (Überstand der Proteinfällung) wurde unmittelbar für Absorptions- und Fluoreszenzmessungen eingesetzt und lieferte den noch fehlenden, einwandfreien Nachweis dafür, daß neben Eisen auch eine Flavinkomponente Bestandteil der Hydrogenase ist:

1. Der TCA-Extrakt wies ein flavintypisches Spektrum auf mit ausgeprägten Banden bei 447 und 375 nm, die auf Zusatz eines Überschusses an Dithionit wieder verschwanden (Abbildung 34, Kurven 3 und 4). Eine Identifizierung des Flavins allein aufgrund des Absorptionsspektrums ist nicht möglich, weil die Absorptionsmaxima von FMN (445 und 373 nm) und FAD (450 und 375 nm) zu dicht beeinander liegen, und ihre Positionen sich außerdem je nach Lösungsmittel leicht verschieben können.

   Das Absorptionsprofil der Hydrogenase änderte sich nach Abtrennung des Flavins nicht entscheidend (vgl. Differenzspektrum, natives Enzym gemessen gegen TCA-Extrakt; Abbildung 34, Kurve 2). Die Bande bei 420 nm, leicht verschoben, erschien jetzt bei 415 nm. Das Maximum bei 380 nm trat nicht mehr auf, stattdessen entstand ein deutlicherer peak bei 336 nm.
2. Das extrahierte Flavin zeigte ein imposantes Exzitationsspektrum (Maxima: 285, 383 und 460 nm; vgl. Abbildung 33a, Kurve 1) und gegenüber dem enzymgebundenen Flavin eine um das 12fache gesteigerte Fluoreszenz bei 526 (Abbildung 33b, Kurve 1).

   Nach BESSEY et al. (1949) ist die Fluoreszenzintensität des FMN über einen weiten pH-Bereich (3-8,5) nahezu unverändert, während die FAD-Fluoreszenz ein stark ausgeprägtes pH-Optimum bei 3,0 besitzt und bei neutralem pH nur noch ca. 1/6 ihrer maximalen Intensität aufweist.

   Da eine Ansäuerung des neutralen TCA-Extrakts bis auf pH 3,0 zu keinerlei Steigerung der Fluoreszenz führte, ist anzunehmen, daß es sich bei dem hydrogenasegebundenen Flavin um FMN handelt. Eine endgültige Identifizierung und Zuordnung ist aber erst mit Hilfe chromatographischer oder elektrophoretischer Nachweismethoden möglich.

3.12. Hemmstoffanalytische Untersuchungen

3.12.1. Hemmung durch SH-Reagenzien

SH-Gruppengifte sind bisher vielfach als Hemmstoffe der Hydrogenasen erkannt worden. Auch auf die lösliche Hydrogenase von H16 wirkten SH-Reagenzien wie p-Chloromercuribenzoat (p-CMB) und Schwermetallsalze, gegenüber denen Thiolgruppen als besonders empfindlich bekannt sind, sehr stark aktivitätshemmend. Die für eine Halbwertshemmung (50%-Hemmung) notwendige Hemmstoffkonzentration (reduziertes Enzym) betrug bei Anwendung der unter Abbildung 35 angegebenen Bedingungen für $HgCl_2$ 0,27 µM, für p-CMB 0,8 µM, für $CuCl_2$ 4,5 µM und für $CdSO_4$ 12 µM (Tabelle 11).
Die Hemmung durch p-CMB wurde vollständig verhindert, wenn 1 mM Glutathion vorher oder gleichzeitig mit p-CMB zugesetzt wurde. Eine schon stattfindende Hemmung konnte teilweise wieder aufgehoben werden. Der Grad der Reversibilität hing von der Einwirkungsdauer des p-CMB und seiner Konzentration ab.
Wie sind nun die hier geschilderten Hemmeffekte zu bewerten? In vielen Arbeiten werden die durch SH-Reagenzien verursachten Enzymhemmungen vorschnell als Hinweis oder Nachweis für die Existenz funktioneller, freier SH-Gruppen angesehen. Die Berücksichtigung folgender zwei Punkte verdeutlicht aber, daß die bloße Aussage, eine Hemmung bestimmten Ausmaßes nachgewiesen zu haben, wenig informativ und aussagekräftig ist.

1. Auch die Bindung nichtfunktioneller, freier SH-Gruppen, die am aktiven Zentrum oder in seiner mehr oder weniger unmittelbaren Nähe lokalisiert sind, kann aufgrund struktureller Veränderung des Proteins oder aufgrund sterischer und/oder elektrostatischer Behinderung eine Enzymreaktion entscheidend modifizieren und hemmen (WEBB, 1966). Da die Mehrzahl der Enzyme zwischen 5 und 30 Sulfhydryl-Gruppen enthält, ist statistisch zu erwarten, daß sich eine oder gar mehrere auch in der Nähe des aktiven Zentrums befinden.

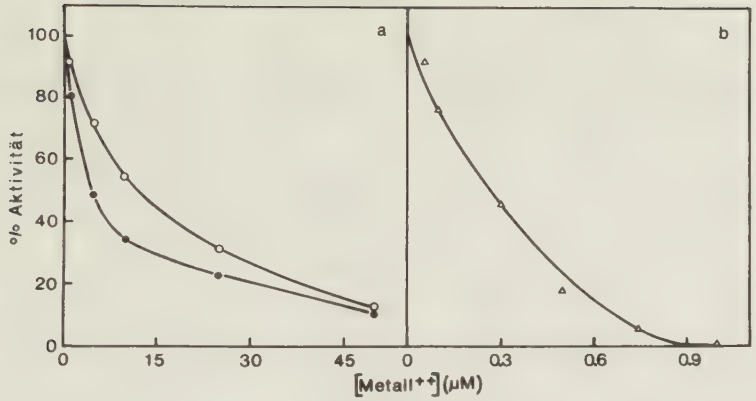


Abb. 35: Abhängigkeit der Hydrogenaseaktivität von der Hg^{++}-Cd^{++}- und Cu^{++}-Ionenkonzentration

Die in Testpuffer (50 mM Tris-HCl; pH 8,0; H_2-gesättigt) aufgenommene Hemmstofflösung wurde mit dem Enzym versetzt (5 µg in 10 µl) und mit Testpuffer auf ein Volumen von 0,3 ml gebracht. Dieses Reaktionsgemisch wurde 2 min bei 30°C vorinkubiert, ehe es mit Puffer auf 2,9 ml aufgefüllt und die Reaktion durch Zusatz von 0,8 mM NAD (0,1 ml) gestartet wurde. Die in der Abbildung angegebenen Metallionenkonzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration im 3 ml-Ansatz.

○ $CdSO_4$ (a); ● $CuCl_2$(a); △ $HgCl_2$(b)

2. Bei der Untersuchung der Ferredoxine von Clostridien konnten LOVENBERG et al. (1963) nachweisen, daß organische Quecksilberverbindungen nicht nur mit freien SH-Gruppen reagieren, sondern auch mit metallgebundenem Schwefel und mit anorganischem Sulfid.

Dieser letzte Punkt ist gerade für die Hydrogenasen von besonderer Bedeutung, da labiler Schwefel bereits im H_2-produzierenden und ferredoxinabhängigen Enzym von C.pasteurianum nachgewiesen worden ist und auch als Bestandteil anderer Hydrogenasen diskutiert wird (MORTENSON und CHEN, 1974).

Tab. 11: Wirkung von Hemmstoffen auf die Hydrogenaseaktivität

Hemmstoff	Konzentration (mM)	Hemmung (%)	Hemmstoff	Konzentration (mM)	Hemmung (%)
$NiCl_2$	0,1	20	p-CMB + NAD	0,01+0,8	27
	2	33			
$ZnCl_2$	0,65	50			
$HgCl_2$	0,0027	50	O_2	0,12	2
	0,001	100		0,7	20
$CuCl_2$	0,0045	50	KCN	0,1	14
	0,2	100		0,6	50
$CdSO_4$	0,012	50	Na_2S	0,057	0(50)
	1	99		0,5	74(100)
3-Brompyruvat	1	10	EDTA	0,01	-53
Natriumjodacetat	1	10	batho-Phenanthrolin	0,07	-24
p-CMB	0,0008	50(17)	α,α'-Dipyridyl	0,2	-20
	0,01	91(70)			
	0,05	100(99)	Tiron	1	0
p-CMB+ Glutathion	0,01+1	0	CO	0,54	0
			NaN_3	1	14

Reaktionsansatz und -bedingungen waren den Angaben unter Abb. 35 entsprechend. Die unter "Hemmung" aufgeführten Werte in der Tabelle beziehen sich auf das reduzierte Enzym. Die Hemmwirkungen auf das oxidierte Enzym unterschieden sich nur unwesentlich und wurden daher nicht gesondert aufgeführt. Lediglich die von Natriumsulfid und p-CMB auf die oxidierte Hydrogenase bewirkten Effekte wurden in Klammern mit angegeben.

In den folgenden Versuchen wurden daher die Reaktionsraten in Abhängigkeit von der Inhibitor-Konzentration bei verschiedenen Substratkonzentrationen gemessen (Abbildung 36), um so präzisere Angaben über den Charakter der p-CMB-bedingten Hemmung machen zu können, d.h. um sie als entweder unspezifische oder als komplexere, schwer analysierbare Hemmung, die etwa bewirkt sein kann durch die Betroffenheit mehrerer SH-Gruppen, einzuschätzen, oder sie gegenüber einem Substrat oder gar gegenüber beiden Substraten als kompetitiv zu erkennen.

Die Auftragung der reziproken Reaktionsraten nach DIXON (1953) ergab Geraden, die sich entweder in einem Punkt auf der x-Achse trafen (Abhängigkeit der Aktivitätshemmung von der H_2-Konzentration; Dixon-Plot, Abbildung 36b) oder sich oberhalb der Abszisse im vierten Quadranten des Koordinatensystems schnitten (Abhängigkeit der Aktivitätshemmung von der NAD-Konzentration; Dixon-Plot, Abbildung 36d).

Diese Ergebnisse besagen, daß p-CMB gegenüber NAD eine kompetitive Hemmung und gegenüber H_2 eine nichtkompetitive Hemmung ausübt. Die Erhöhung der NAD-Konzentration erhöht auch die Affinität der Hydrogenase zum Substrat und vermindert den Hemmeffekt, während die H_2-Konzentration keinerlei Einfluß auf den Grad der Hemmung hat.

Der aus Abbildung 36d ermittelte K_i-Wert der kompetitiven Hemmung beträgt 2,5 µM.

Der kompetitive Charakter der Hemmung wurde auch durch die Schutzfunktion, die NAD als Substrat ausübt, bestätigt. Ließ man das Enzym zunächst mit NAD reagieren, ehe p-CMB zugesetzt wurde, so war die Hemmwirkung unmittelbar nach Zugabe des Inhibitors zu 80% vermindert.

Die Kinetiken der p-CMB-Hemmung und die von NAD ausgehende Schutzfunktion lassen definitiv die Aussage zu, daß die Hydrogenase mindestens eine freie, p-CMB-sensible, gegenüber alkylierenden Agenzien nicht reaktive, (vgl. Tabelle 11) für die Enzymkatalyse aber essentielle SH-Gruppe besitzt, die für die Bindungen von NAD verantwortlich oder zumindest an ihr beteiligt ist.

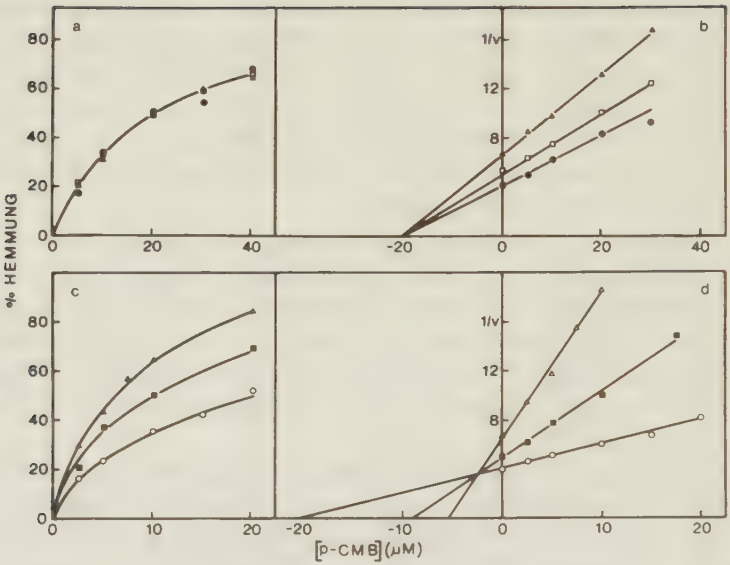


Abb. 36: Hemmung der Hydrogenaseaktivität durch p-CMB

Der Reaktionsansatz enthielt in 3 ml: 50 mM Tris-HCl-Puffer (pH 8,0) und 5 µg Protein. Die p-CMB-Konzentration wurde wie in den Abbildungen angegeben variiert. Die eingesetzten Substratkonzentrationen sind aus der Erklärung der Symbole zu ersehen. Auf eine Vorinkubation des Enzyms wurde verzichtet, um eventuell zusätzlich auftretende, unspezifische Wirkungen weitestgehend zu vermeiden.

a: Nichtkompetitive Hemmung von p-CMB gegenüber H_2
b: Dixon-Auftragung zu a
c: Kompetitive Hemmung von p-CMB gegenüber NAD
d: Dixon-Auftragung zu c

▲ 0,113 mM H_2; 0,8 mM NAD
□ 0,257 mM H_2; 0,8 mM NAD
● 0,450 mM H_2; 0,8 mM NAD
△ 0,260 mM NAD; 0,450 mM H_2
■ 0,500 mM NAD; 0,450 mM H_2
○ 0,800 mM NAD; 0,450 mM H_2

Die Beteiligung einer funktionellen SH-Gruppe an der NAD-Bindung ist Kennzeichen vieler Dehydrogenasen (EISELE und WALLENFELS, 1970) und ist insbesondere für die Alkohol-DH (Hefe) schon mehrfach nachgewiesen worden (RABIN und WHITEHEAD, 1962; PLAPP et al., 1968 u.a.).
Die nichtkompetitive Hemmung von p-CMB gegenüber H_2 scheint zunächst nicht dafür zu sprechen, daß das H_2-aktivierende Zentrum der Hydrogenase einen Fe-S-Komplex enthält. Es ist aber denkbar und für nonheme-iron-Proteine vom Ferredoxin-Typ schon häufig gefunden worden (MALKIN und RABINOWITZ, 1967; PETERING und PALMER, 1967), daß der Komplex in der inneren Struktur des Proteins verborgen ("maskiert") liegt und im Fall der Hydrogenase für andere Verbindungen als H_2, das kleinste aller Moleküle , nicht zugänglich ist.
Im Vergleich zur löslichen Hydrogenase von H16 zeigt die H_2-DH von P.ruhlandii geringe Empfindlichkeit gegenüber p-CMB (BONE, 1963).
Trotz fünfminütiger Vorinkubation in Gegenwart einer relativ hohen p-CMB-Konzentration (0,7 mM) wurde das reduzierte Enzym von P.ruhlandii nur zu 53% gehemmt, das oxidierte Enzym gar nicht. Offensichtlich sind an dieser Reaktion träge reagierende SH-Gruppen beteiligt, die erst durch Spaltung (Reduktion) einer Disulfidbildung (Metall-Schwefel-Bindung) freigesetzt werden. Die unterschiedliche Wirkung des Inhibitors auf das oxidierte und reduzierte Enzym konnte auch für die H16-Hydrogenase bestätigt werden (vgl. Tabelle 11 und "Diskussion").

3.12.2. Hemmung durch molekularen Sauerstoff

Die leichte Reaktivierbarkeit der Hydrogenase auch in Abwesenheit von Reduktionsmitteln, ebenso wie die außergewöhnliche Stabilität der unter Luft aufbewahrten Enzymlösungen sprachen für die O_2-Unempfindlichkeit und ließen auch eine geringe Wirkung des Sauerstoffs auf die Reaktionsrate erwarten. Die gemessenen Hydrogenaseaktivitäten in Gegenwart verschiedener O_2-

Konzentrationen (die H_2-Konzentration wurde stets konstant gehalten, als Füllgas diente jeweils N_2) bestätigten diese Erwartung. Bei Partialdrücken(P_{O_2}), die unter 20% lagen, war keine Hemmung sichtbar, die über den Meßfehlerbereich hinausging. Befand sich im Gasgemisch 60% O_2, entsprechend einer Konzentration im Reaktionsgemisch von ca. 0,7 mM, so war die Reaktionsgeschwindigkeit auch dann nur um 20-25% vermindert (Tabelle 11).

3.12.3. Einfluß von Schwermetallgiften auf die Enzymaktivität

Die Eisenhaltigkeit der Hydrogenase wurde durch die charakteristische Lichtabsorption im sichtbaren Wellenlängenbereich (Kapitel 3.11.1.) demonstriert.
Mit Hilfe des Einsatzes von Schwermetallgiften sollte versucht werden, die möglicherweise katalytisch funktionelle Rolle des Eisens nachzuweisen.
Keines der Chelate bildenden Agenzien jedoch löste eine Hemmung der Hydrogenase aus. Im Gegenteil, EDTA (53%), batho-Phenanthrolin (24%) und α,α'-Dipyridyl (20%) verursachten sogar eine Aktivitätssteigerung (Abbildung 37a; Tabelle 11), die auf eine durch Wechselwirkungen mit apolaren Seitenketten bedingte Konfomationsänderung zurückzuführen ist (VALEE und WAKKER, 1970).
Als wirkungslos erwiesen sich Kohlenmonoxyd und Azid, ebenso wie der für oxidiertes Eisen spezifische Komplexbildner Tiron (Tabelle 11).
Wie sind diese Ergebnisse zu interpretieren? Von frühesten Studien an wurde die Hydrogenase für ein metall-, meist eisenhaltiges Enzym gehalten. Diese Einschätzung stützte sich vor allem auf Hemmwirkungen, die von Metallkomplexbildnern und anderen als Schwermetallgifte bekannten Verbindungen wie Cyanid, Kohlenmonoxyd usw. ausgingen (HOBERMANN und RITTENBERG, 1943; KRASNA und RITTENBERG, 1954; TEMPERLI et al., 1960 u.a.). GEST (1952) konnte nachweisen, daß Eisenkomplexbildner die Hydroge-

nasen von Rhodospirillum rubrum und E.coli nicht hemmten. Zum damaligen Zeitpunkt wurde daraus das Fehlen der Teilnahme eines Schwermetallkations am katalytischen Vorgang abgeleitet. Am Beispiel der Hydrogenase von C.pasteurianum konnten aber NAKOS und MORTENSON (1971b) nachweisen, daß diese Folgerung unrichtig ist. Dieses Enzym wurde nämlich als Eisen-Schwefel-Protein identifiziert, das 12 Eisenatome enthält (CHEN und MORTENSON, 1974), dessen Aktivität aber trotzdem durch Komplexbildner nicht beeinträchtigt wird. Die Resistenz des Eisens ist zu erklären 1. durch die in Kapitel 3.12.1. bereits erwähnte strukturbedingte sterische Behinderung und die Unzugänglichkeit des verborgen liegenden Fe-S-Komplexes und 2. durch die Reaktionsträgheit des Eisens selbst infolge der Festigkeit seiner Bindung an das Protein.

Diese Resistenz gegenüber Eisenkomplexbildnern ist nicht nur bei der Hydrogenase von C.pasteurianum beobachtet worden, sondern ist ein generelles Merkmal der Ferredoxine und der nonheme iron-Proteine vom Ferredoxintyp (MALKIN, 1973).

Die Eisenhaltigkeit einer Hydrogenase, und die Wirkungslosigkeit von Komplexbildnern auf die Hydrogenase sind daher kein Widerspruch, sondern eher eine erwartungsgemäße Bestätigung dafür, daß ein Eisen-Schwefel-Protein vorliegt. Ausgehend von der Annahme, daß die aktiven Zentren aller Hydrogenasen sehr ähnlich oder identisch aufgebaut sind, gehen MORTENSON und CHEN (1974) sogar soweit, anzunehmen, daß es sich bei den gefundenen Hemmungen früherer Studien an Hydrogenasen verschiedener Herkunft um Irrtümer handelte, die möglicherweise auf einer partiellen Oxidation der Enzyme basierten.

Mit Spinatferredoxin (FRY und SAN PIETRO, 1962) und den Ferredoxinen von Clostridien (MALKIN und RABINOWITZ, 1967) konnte gezeigt werden, daß nach langandauernder Inkubation bzw. langandauerndem Kontakt von Protein und Hemmstoff eine, wenn auch extrem langsame Reaktion zu beobachten ist.

Einen Hinweis darauf, daß auch das Eisen der H_2-DH von H16 zumindest träge mit Komplexbildnern reagiert, wurde schon im

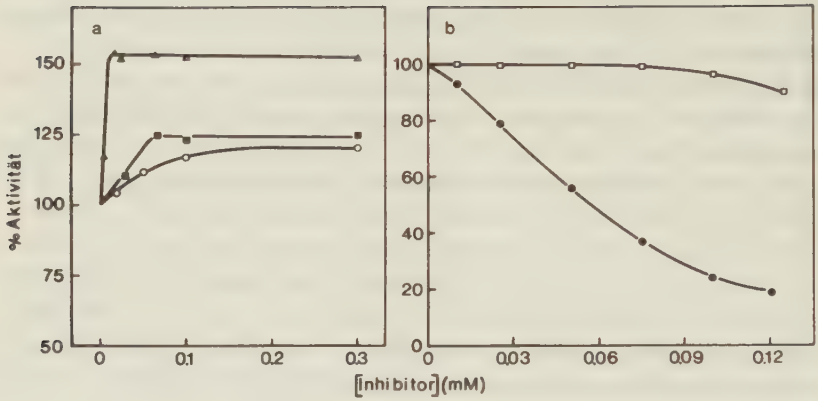


Abb. 37: Wirkung von Schwermetallgiften auf die Aktivität der Hydrogenase

Der Reaktionsansatz und die Bedingungen der Vorbehandlung des Enzyms waren den Angaben unter Abb. 35 entsprechend.

a: △ EDTA; ■ batho-Phenanthrolin; ○ α,α'-Dipyridyl

b: □ Na_2S (reduziertes Enzym); ● Na_2S (oxidiertes Enzym)

Zusammenhang mit den Stabilitätsversuchen (Kapitel 1.4.) erhalten. Die Aufbewahrung des Enzyms in Gegenwart von 1 mM EDTA führte innerhalb einer Woche zu 100% Aktivitätsverlust.

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse sind daher die Aktivitätshemmungen, die durch Cyanid und Sulfid hervorgerufen wurden (siehe Tabelle 11), durch Reagenzien also, die auch als Schwermetallgifte bekannt sind, nicht auf Metallkomplexbildungen zurückzuführen, sondern es ist eher anzunehmen, daß es nach Erreichen einer bestimmten Hemmstoffkonzentration zur Spaltung einer oder mehrerer Disulfidbrückenbindungen kommt, die eine Destabilisierung und Veränderung der Enzymstruktur zur Folge

hat. Die oxidierte und reduzierte Form der Hydrogenase war gegenüber Na_2S (und in weniger ausgeprägtem Maße auch gegenüber KCN) unterschiedlich empfindlich. Die Hemmung des oxidierten Enzyms setzte bei einer Na_2S-Konzentration von 0,005 mM, die des reduzierten Enzyms bei 0,08 mM ein. Beide Hemmkurven verliefen sigmoid.

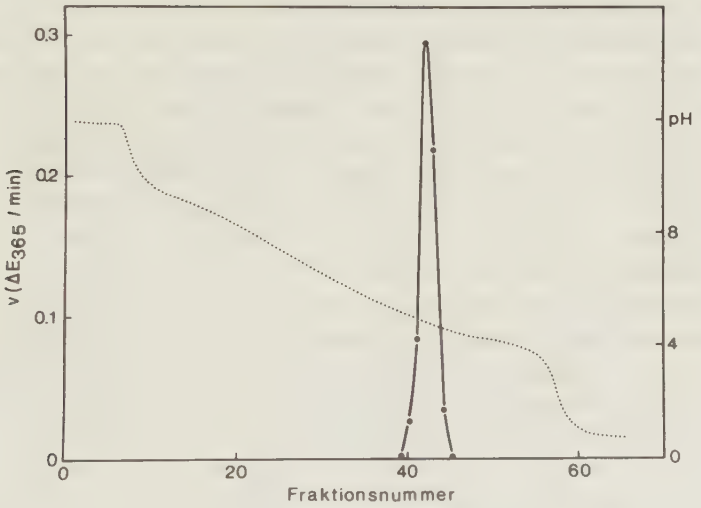


Abb. 38: Isoelektrische Fokussierung der Hydrogenase

Die Isoelektrische Fokussierung wurde in einer 110 ml fassenden LKB-Fokussiersäule durchgeführt. Der pH-Gradient (pH 3,0-10,0) wurde mit Hilfe einer LKB-Carrierampholytlösung eingestellt und zusätzlich durch einen Saccharosedichtegradienten stabilisiert. Die Stufungen im sauren und alkalischen Bereich des pH-Gradienten wurden verursacht durch die die Elektroden umgebenden Kathoden- und Anodenlösungen, die NaOH bzw. H_2SO_4 enthielten. Es wurde insgesamt 1 ml Hydrogenaselösung (1 mg Protein) 48 Std bei einer Spannung von 310 V und einer Temperatur von 6°C fokussiert. Der Säuleninhalt wurde anschließend eluiert und in 1,8 ml-Fraktionen gesammelt.

····pH-Gradient; ● Hydrogenaseaktivität

3.13. Bestimmung des Isoelektrischen Punkts

Der Isoelektrische Punkt (IEP) eines Proteins läßt sich experimentell mit Hilfe der Isoelektrischen Fokussierung bestimmen, die auf der Ausbildung eines pH-Gradienten im elektrischen Feld beruht und auf der Wanderung ampholytischer Verbindungen bis zu dem Punkt, an dem der pH des Gradienten mit dem IEP der jeweiligen Verbindung identisch ist.
Die Fokussierung wurde in einer 110 ml fassenden LKB-Fokussiersäule durchgeführt, die zuvor mit den Elektroden- und Dichtegradientenlösungen (leichte und schwere Lösung) gefüllt worden war. Die Dichtegradientenlösungen enthielten neben Saccharose, das die Säulenfüllung gegen Konvektion und Vermischung stabilisieren sollte, Carrierampholyte (Ampholine), die für die Ausbildung des pH-Gradienten in einem pH-Bereich zwischen 3,0 und 10,0 verantwortlich waren.
Für die lösliche Hydrogenase konnte ein IEP von 4,85 ermittelt werden. Ein großer Teil des Enzyms fiel während der Fokussierung, die in salzfreiem Medium stattfand, aus oder wurde inaktiviert. Die verbleibende Aktivität bildete im pH-Bereich des IEP eine scharfe Bande (Abbildung 38).

3.14. Molekulargewichtsbestimmung

Wie der IEP, so ist auch das Molekulargewicht (MG) der Hydrogenasen von Wasserstoffbakterien noch nie bestimmt oder veröffentlicht worden. Es war daher von Interesse zu ergründen, ob und wieweit das MG der löslichen Hydrogenase von H16 von dem für C.pasteurianum (NAKOS und MORTENSON, 1971b) und D.vulgaris (LEGALL et al., 1971) bestimmten MG von 60 000 Dalton abweicht.

Das MG wurde nach zwei verschiedenen Methoden bestimmt:

1. Durch Ermittlung der relativen Laufstrecke in einem Saccharose-Gradienten und Bestimmung der Svedberg-Konstanten nach MARTIN und AMES (1961)

2. durch Gelfiltration auf Sephadex G-200 in Gegenwart von Referenzproteinen nach ANDREWS (1964).

3.14.1. Kontinuierliche Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation

Die Sedimentationsrate eines Makromoleküls ist eine Funktion seines Molekulargewichts und seiner Form und wird als Sedimentationskoeffizient $S_{20,\omega}$ ausgedrückt. Vergleicht man in viskosen Konzentrationsgradienten Proteine unbekannter Sedimentationskoeffizienten mit solchen von bekanntem $S_{20,\omega}$-Wert, so genügt die relative Lage der Proteinbanden zur Bestimmung der Svedberg-Konstanten.

Zur Bestimmung der Sedimentationskonstanten der Hydrogenase wurden Katalase ($S_{20,\omega}$= 11,3), Aldolase ($S_{20,\omega}$= 7,82) und ADH ($S_{20,\omega}$= 7,61) als Referenzenzyme eingesetzt und in verschiedenen Ansätzen einzeln oder gemeinsam mit der Hydrogenase auf einen präformierten, linearen Saccharose-Gradienten (5-30% w/w in 50 mM KP-Puffer, pH 7,0) aufgetragen. Nach der Zentrifugation (15 Std bei 40 000 Upm) wurden die Gradienten den Zentrifugenröhrchen durch Anstechen mittels einer Hohlnadel entnommen und die Proteinbanden durch quantitative Aktivitätsbestimmung der gesamten 5-Tropfen-Fraktionen lokalisiert (Abbildung 39).
Für die Hydrogenase ergab sich eine Sedimentationskonstante von $S_{20,\omega}$= 9,42, die nach folgender Gleichung bestimmt wurde:

$$R = \frac{\text{Wanderungsstrecke des Standards}}{\text{Wanderungsstrecke der Probe}} = \frac{S_{20,\omega}\ \text{Standard}}{S_{20,\omega}\ \text{Probe}}$$

Das Molekulargewicht berechnete sich aus den bekannten Koeffizienten und dem bekannten MG des Referenzenzyms nach SCHACHMANN (1959) aus folgender Beziehung:

$$\frac{S_{20,\omega\ \text{Standard}}}{S_{20,\omega\ \text{Probe}}} = \left(\frac{MG_{\text{Standard}}}{MG_{\text{Probe}}}\right)^{2/3}$$

Unabhängig davon, ob die Hydrogenase mit jeweils nur einem Referenzprotein oder mit mehreren Enzymen gemeinsam ultrazentrifugiert wurde und auch davon, welches Protein als Bezugssystem gewählt wurde, das für die Hydrogenase ermittelte MG lag stets gut reproduzierbar zwischen 200 000 und 210 000 Dalton.

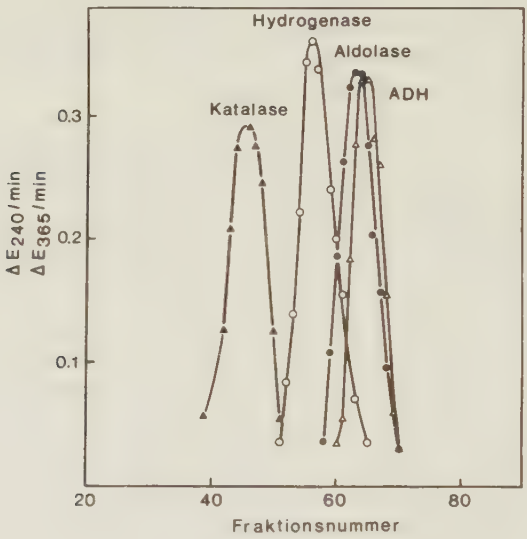


Abb. 39: Sedimentation der Hydrogenase und der Referenzenzyme Katalase, Aldolase und ADH in einem linearen Saccharose-Gradienten

13 ml eines linearen Saccharose-Gradienten (5-30% w/w in 50 mM KP-Puffer, pH 7,0) wurden mit 0,2 ml Enzymlösung überschichtet und 15 Std bei 40 000 Upm zentrifugiert. Der Gradient wurde durch Anstechen des Zentrifugenröhrchens in 5-Tropfen-Fraktionen entnommen.

3.14.2. Sephadex G-200-Gelfiltration

Die Bestimmung des Molekulargewichts durch Gelfiltration beruht auf der behinderten Diffusion von Proteinen in einer Gelmatrix. Diese Diffusion ist in erster Näherung von der Molekülgröße und damit vom MG des Proteins abhängig und bestimmt dessen Wanderungsgeschwindigkeit im Gel. Mit Hilfe von Referenzproteinen bekannten Molekulargewichts läßt sich aus der graphischen Auftragung der Elutionsvolumina gegen den Logarithmus der Molekulargewichte das unbekannte MG bestimmen (Abbildung 40).
Mittels dieser Methode konnte für die Hydrogenase ein Molekulargewicht von 204 600 Dalton ermittelt werden. Da die Werte beider angewandter MG-Bestimmungsmethoden sehr gut übereinstimmten, kann für die lösliche Hydrogenase von H16 ein recht exaktes Molekulargewicht von 205 000 Dalton angenommen werden.

3.15. SDS-Gelelektrophorese: Versuche zur Bestimmung von Anzahl und Größe der Enzymuntereinheiten

Wurde die Hydrogenase vor der Durchführung der SDS-Elektrophorese in Gegenwart von 1% SDS und 1% Mercaptoäthanol bei verschiedenen Temperaturen, unterschiedlich lange und in Abwesenheit oder Gegenwart von Harnstoff inkubiert, so entstanden im Polyacrylamid-Gel mehrere Banden, deren Anzahl (4-8), Lage und Intensität sich je nach variierten Denaturierungsbedingungen veränderte. Die Unterschiede im elektrophoretischen Bild bewiesen hinlänglich, daß die Vielzahl der Banden nicht auf Verunreinigungen, sondern auf suboptimale Denaturierungsbedingungen und unterschiedliche und unzureichende Beladung des Proteins mit SDS zurückzuführen war.
SDS spaltet Proteine in Untereinheiten auf und bildet mit diesen, bei SDS-Konzentrationen über 0,02% (0,8 mM), hochgeordnete, stäbchenförmige Komplexe (REYNOLDS und TANFORD, 1970). Polyacrylamid-Elektrophorese in Gegenwart von SDS trennt Poly-

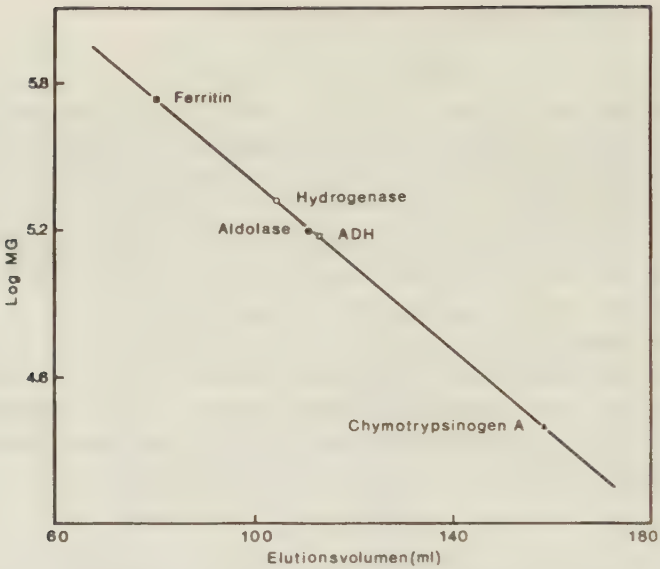


Abb. 40: Molekulargewichtsbestimmung der Hydrogenase durch Sephadex G-200-Gelfiltration

Eine Säule (2,5 x 45 cm, Füllhöhe: 38 cm), die mit Sephadex G-200 fine homogen gepackt war, wurde mit 50 mM KP-Puffer (pH 7,0) äquilibiert. Die in der Abbildung aufgeführten Referenzproteine wurden in 1,2 ml Hydrogenaselösung aufgenommen (Gesamtproteingehalt: 12 mg) und auf die Säule durch Unterschichten aufgetragen. Es wurden 200 Fraktionen zu je 1,2 ml gesammelt. Die Durchflußrate betrug 12 ml/Std.

peptide nicht nach Ladung, sondern allein nach dem Molekulargewicht auf (SHAPIRO et al., 1967; WEBER und OSBORN, 1969), vorausgesetzt, die Polypeptide sind ausreichend denaturiert, alle Disulfidbrücken sind reduziert und das Protein bzw. seine Untereinheiten sind optimal mit SDS beladen (1,4 g SDS/g Protein). Die Verminderung des SDS-Bindungsvermögens, verursacht etwa durch unvollständige Reduktion des Proteins, behindert die Aus-

bildung des gestreckten SDS-Protein-Komplexes und verändert somit die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins (WEBER et al., 1972).

Wurde die Hydrogenase vor der Elektrophorese in Gegenwart von 1% SDS, 1% Dithioerythritol und 8 M Harnstoff unter einer H_2-Atmosphäre 2 Std bei 37°C inkubiert, so entstanden im Polyacrylamid-Gel drei deutliche, etwa gleich starke Banden, für die die Molekulargewichte 28 000, 58 000 und 68 000 Dalton bestimmt wurden. Dieses Ergebnis läßt folgende Untereinheitenstrukturen für die Hydrogenase möglich erscheinen:

1. Die Hydrogenase besteht aus insgesamt vier Untereinheiten, zwei 28 000-Einheiten und je einer 58 000- und 68 000-Einheit. Drei der vier Untereinheiten sind nicht identisch. Die Existenz von drei nicht identischen Untereinheiten innerhalb eines Enzyms tritt nicht häufig auf, ist aber auch nicht außergewöhnlich. Gerade kürzlich wurde eine Nitrat-Reduktase (Klebsiella aerogenes) beschrieben, ebenfalls ein nonheme iron-Protein, das aus Untereinheiten mit Molekulargewichten von 117 000, 57 000 und 52 000 Dalton besteht, die im Verhältnis 1:1:2 vorliegen (VAN'T RIET und PLANTA, 1975).
2. Ließe sich die 58 000-Einheit durch weitere Optimierung der Denaturierungsbedingungen in zwei Monomere aufspalten, so würde das bedeuten: Die Hydrogenase besteht aus insgesamt vier Untereinheiten, zwei 28 000- und zwei 68 000-Einheiten. In diesem Falle wären zwei der vier Untereinheiten nicht identisch.

Die Untersuchungen zur Aufklärung der Untereinheitenstruktur der Hydrogenase sind keineswegs abgeschlossen. Notwendig ist a) die Anwendung eines alternativen Denaturierungsverfahrens, das von dem Standardverfahren und seinen möglichen Variationen deutlich abweicht. Hier bietet sich die Behandlung des Enzyms mit Perameisensäure an. Notwendig ist b) die MG-Bestimmung der Untereinheiten mit Hilfe der analytischen Ultrazentrifuge, einer Methode, die von der Beladung des Enzyms mit SDS unabhängig ist.

DISKUSSION

Die lösliche Hydrogenase von A.eutrophus H16

1. Reduktive Aktivierung und Stabilität

Die Differenzierung von reduziertem und oxidiertem Enzym, aktiver und inaktiver Enzymform, in den bisherigen Arbeiten über Hydrogenasen wenig oder gar nicht beachtet, erwies sich für die lösliche Hydrogenase von A.eutrophus H16 als von ganz entscheidender Bedeutung, insbesondere was Reaktivität, Stabilitätsverhalten, kinetische Charakteristiken und Acceptorspezifität des Enzyms betrifft.
Das abnorme Stabilitätsverhalten, eines der hervorstechenden Merkmale der löslichen Hydrogenase von H16, die möglichen Einflüsse von Sauerstoff auf das Enzym und der Vorgang der reduktiven Aktivierung sollen im ersten Diskussionsabschnitt Gegenstand der Erörterung sein.

Bei der Betrachtung des Einflusses oxidierender und reduzierender Bedingungen auf das Enzym ist ausdrücklich zwischen dem Einfluß auf die Aktivität und dem Einfluß auf die Stabilität zu differenzieren.
Die Hydrogenase ist in ihrem oxidierten Zustand nicht reaktionsfähig aber sehr stabil. Im Zuge der NAD-Reduktion aktiviert sich das Enzym mit Hilfe des Substrats H_2 und des entstehenden Produkts NADH selbst. Die Gegenwart von Reduktionsmitteln und von zugesetzten NADH vermag daher zwar die Reaktionsanlaufphase aufzuheben, nicht aber die Aktivität nennenswert zu verändern.
Die reduzierte Hydrogenase ist die reaktionsfähige, aktive, aber extrem instabile Form des Enzyms. Alle reduzierenden Bedingungen und Verbindungen (NADH, Reduktionsmittel, H_2 in Gegenwart katalytischer Mengen NADH), die die Reaktionsanlaufphase aufzuheben, also das Enzym in die aktive Form zu überführen vermögen, bedingen andererseits den eben in dieser Form stattfindenden Prozeß der raschen, irreversiblen Inaktivierung.

Oxidierende Bedingungen führen also zu einer Inaktivierung des Enzyms, die aber selbst nach längerer Aufbewahrung unter Luft noch vollständig und leicht reversibel ist. Reduzierende Bedingungen aktivieren das Enzym zunächst, führen aber, bedingt durch die Instabilität der reaktionsfähigen Enzymform indirekt wieder zu einer in diesem Fall irreversiblen Inaktivierung.

Die Stabilitätseigenschaften der löslichen Hydrogenase von H16 stehen in krassem Gegensatz zu der O_2-Empfindlichkeit und dem Stabilitätsverhalten anderer Hydrogenasen, die in den meisten Fällen auf Reduktionsmittel oder zumindest auf molekularen Wasserstoff als Stabilisator angewiesen sind.
Für die Stabilität der Hydrogenasen von D.vulgaris ist eine streng anaerobe Aufbewahrung unter H_2 erforderlich (SADANA und JAGANNATHAN, 1956). Das gleiche gilt für die Hydrogenasen von Clostridium butylicum (PECK und GEST, 1957) und E.coli (GEST, 1952). Von REPASKE (1962) wurde berichtet, daß sowohl für die Aktivität als auch für die Stabilität der Hydrogenase von A. eutrophus neben einer H_2-Atmosphäre die Gegenwart von Reduktionsmitteln essentiell ist. Noch sauerstoffempfindlicher sind die Hydrogenasen von Clostridium kluyveri und C.pasteurianum (SHUG et al., 1956). Kontakt mit O_2 führt bei diesen Enzymen innerhalb kurzer Zeit zu irreversiblem Aktivitätsverlust. Streng anaerobe Arbeitsweise, schon beim Aufschließen der Zellen, und die Gegenwart von Reduktionsmitteln sind erforderlich.
Eine Abhängigkeit von Reduktionsmitteln konnte zwar bei keiner der Hydrogenasen, die im Rahmen dieser Arbeit vergleichend untersucht worden waren, festgestellt werden, alle, sowohl alle partikulären, als auch, mit Ausnahme der H16-Hydrogenase, alle löslichen Hydrogenasen waren jedoch ausgesprochen angewiesen auf eine H_2-Atmosphäre, dies gilt insbesonders für die H_2-DH der A.eutrophus-Stämme. Aufbewahrung der Enzymextrakte unter Luft führte schon innerhalb weniger Tage zum irreversiblen Verlust der gesamten Aktivität.
Angesichts dieser Vergleiche erscheint die durch H_2 und reduzierende Verbindungen hervorgerufene Instabilität der löslichen Hydrogenase von H16 als ein außergewöhnliches Phänomen.

Es sind auch Hydrogenasen bekannt, die ähnlich wie die Hydrogenase von H16 als wenig oder gar nicht sauerstoffempfindlich gelten und für die auch in Abwesenheit von H_2 und Reduktionsmitteln eine nennenswerte Stabilität erreicht wurde. Dazu gehören die Enzyme von Azotobacter vinelandii (HYNDMAN et al., 1953), H. ruhlandii (BONE, 1963) und N.opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1974). Es ist aber bisher noch nie gefunden worden, daß ausgerechnet reduzierende Bedingungen die Enzymstabilität herabsetzen.

Sauerstoffbedingte Enzyminstabilität ist zurückzuführen auf die Oxidation von SH-Gruppen oder labilem Schwefel. Bedeutet nun die Sauerstoffunempfindlichkeit der H16-Hydrogenase,daß dieses Enzym mit O_2 keinerlei Reaktionen eingeht? Und wenn es doch mit Sauerstoff reagiert, wäre es denkbar, daß eine solche Oxidation das Enzym zwar in einen nicht reaktionsfähigen Zustand überführt, es damit aber nicht irreversibel inaktiviert, sondern sogar stabilisiert?
Auf diese Fragen soll im Zusammenhang mit der sich anschließenden Diskussion um die Reaktionsanlaufphase und den möglichen Reaktivierungsmechanismus der Hydrogenase eingegangen werden.

Nicht nur bei bisher allen NAD-reduzierenden, sondern auch bei Hydrogenasen, deren Aktivität mit Hilfe anderer Testsysteme bestimmt wird, ist die Beobachtung gemacht worden, daß die jeweilige vom Enzym katalysierte Reaktion, bevor sie ihre maximale Geschwindigkeit erreicht, mit einer Anlaufphase beginnt. Dies trifft z.B. für die Austauschreaktion, katalysiert durch die Hydrogenase von Proteus vulgaris (HOBERMANN und RITTENBERG, 1948), ebenso zu wie für die Cytochrom c_3-Reduktion durch die Hydrogenase von D.vulgaris (HASCHKE und CAMPBELL, 1971).
Welche Erklärungsmöglichkeiten für dieses Phänomen können in Betracht gezogen werden?
Zunächst liegt die Frage nahe, ob die Hydrogenase für die Enzymreaktion einen Cofaktor benötigt, der im Verlauf der Enzympräparation verlorengegangen ist und in dessen Abwesenheit das

Enzym inaktiv ist. Da die Reduktion der Hydrogenase nach Überwindung der Anlaufphase auch ohne irgendwelche Zusätze mit maximaler Rate erfolgt, muß dieser potentielle Cofaktor während der Reaktion vom Enzym selbst gebildet werden, d.h. er muß mit dem Reaktionsprodukt, im Fall der löslichen Hydrogenase von H16 mit NADH, identisch sein. In der Tat ließ sich nachweisen, daß der direkte Zusatz von NADH in den Testansatz je nach Konzentration die Anlaufphase der NAD-Reduktion zu verkürzen oder vollständig zu eliminieren vermag. Diese Beobachtung wurde auch bei den NAD-reduzierenden Hydrogenasen von H.ruhlandii (BONE et al., 1963) und N.opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1974) gemacht. Trotz der reaktivierenden Funktion aber, die NADH erfüllt, kann diese Verbindung nicht als Cofaktor in dem Sinn verstanden werden, daß sie direkt an der Enzymkatalyse, d.h. an der Umsetzung des NAD selbst funktionell beteiligt ist. Diese Vorstellung ist aus folgenden Gründen unwahrscheinlich:

1. NAD und NADH sind zueinander kompetitive Verbindungen, und es nicht denkbar, daß Cofaktor und Substrat von ein und derselben Bindungsstelle gebunden werden bzw. daß diejenige Verbindung, die an der Umsetzung des Substrats beteiligt ist, ja,sie überhaupt erst möglich macht, die Bindung desselben Substrats gleichzeitig behindert.
2. NADH ist ersetzbar a) durch völlig unphysiologische, chemische Reduktionsmittel b) prinzipiell durch alle Bedingungen, die das Enzym zu reduzieren vermögen, wie etwa Einwirkung von UV-Licht.

Es ist also für die Aktivierung der Hydrogenase nicht die Beteiligung eines spezifischen, essentiellen Cofaktors notwendig, sondern vielmehr die Reduktion des Enzyms schlechthin. Jede Form der Reaktivierung entspricht einer "reduktiven Aktivierung", d.h. die Überführung der inaktiven in die reaktionsfähige Enzymform geht grundsätzlich Hand in Hand mit der Reduzierung der Hydrogenase. Indikator dafür ist das stets gemeinsame Auftreten des Reaktionsablaufs ohne Anlaufphase einerseits (Kriterium für das Vorliegen des reaktionsfähigen Enzyms)

und des veränderten Absorptionsspektrums und der entfärbten Hydrogenaselösung andererseits (beides Kriterien für das Vorliegen des reduzierten Enzyms).
Stellt man sich unter "oxidiertem" Enzym das physiologische, oxidierte, also das Enzym vor, dessen reaktive, d.h. wasserstoffaktivierende und -übertragende Gruppen und Atome, wie Eisen und Flavin, oxidiert vorliegen, so erscheint es zunächst unverständlich, warum das Enzym in dieser Form inaktiv sein soll, wo doch gerade der oxidierte Zustand solcher reaktiver Gruppen der elektronen- und wasserstoffaufnahmebereite und damit auch reaktionsbereite Zustand ist. Darüber hinaus: Die Hydrogenasereaktion ist ein Redoxprozeß, d.h. es werden Elektronen aufgenommen und abgegeben, der Enzymzustand wechselt laufend zwischen oxidiert und reduziert. Würde die Vorstellung zutreffen, die physiologische, oxidierte Enzymform sei inaktiv, so würde das bedeuten, daß der Ablauf der NAD-Reduktion gleichzeitig begleitet wäre von einem ständigen Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Enzym. Dies ist nicht denkbar und dennoch ist das Enzym im oxidierten Zustand nachgewiesenermaßen nicht reaktionsfähig. Wie ist das zu erklären?
Die Begriffe "oxidiert" und "reduziert" sind zwar richtig angewendet, sie sind aber trotzdem unzulänglich und irreführend, weil sie nicht definitiv beinhalten, daß das Enzym über seinen physiologischen, oxidierten Zustand hinaus zusätzlich eine oder mehr als eine Oxidation eingehen kann. Findet eine solche Oxidation statt, so ist sie auf den Kontakt mit Sauerstoff zurückzuführen und als Ursache für die Reaktionsunfähigkeit der Hydrogenase anzusehen.
Die Reaktion mit Sauerstoff kann a) zu einer Oxygenierung des Enzyms führen b) zu einer Oxidation von SH-Gruppen und c) zu einer Oxidation von labilem Schwefel.
Die Bindung von molekularem Sauerstoff an das zweiwertige Eisen von Hämoglobin ist seit langem bekannt. Da Hämoglobin dem Sauerstofftransport dient, stellt das oxygenierte Protein in diesem Fall eine wichtige physiologische Verbindung dar.

OKUNUKI et al. konnten 1958 zum ersten Mal bei einem von Hämoglobin verschiedenen Hämeisen-Protein, der Cytochrom-Oxidase, eine Oxygenierung nachweisen. Oxygenierte, oxidierte und reduzierte Proteinform sind durch ihre voneinander differenten Absorptionsspektren zu unterscheiden. Aufgrund der sehr ähnlichen spektralen Eigenschaften von oxidiertem und oxygeniertem Protein wird angenommen, daß das oxidierte Protein bzw. das dreiwertige Eisen oxygeniert wird (MYER, 1972; LEMBERG und BARRET, 1973). Vom Cytochrom o dagegen, einer anderen Endoxidase des Elektronentransports, wird die reduzierte Proteinform oxygeniert (LIU und WEBSTER, 1974). Andere Hämeisen-Proteine, bei denen eine Oxygenierung nachgewiesen wurde, sind die Tryptophan-Pyrrolase aus Pseudomonas ATCC 11299 (MAENO und FEIGELSON, 1967) und die Ferroperoxidase aus Rettich (WITTENBERG et al., 1967). FISHER et al. (1954) demonstrierten mit ganzen Zellen und zellfreien Extrakten von P.vulgaris, daß der Reaktionsanlaufphase eine reversible Oxygenierung zugrunde liegt: Sie verfolgten die Knallgasreaktion und die Austauschreaktion gleichzeitig und stellten fest, daß die Rate der Austauschreaktion in dem Maße zunahm, wie die O_2-Konzentration abnahm. Darüber hinaus fanden sie, daß die Gegenwart von Glucose und Glucose-Oxidase im Testansatz die Reaktionsanlaufphase deutlich verkürzte. Die Autoren stellten folgende These auf: Die Hydrogenase verbindet sich mit O_2 zu einer inaktiven Enzymform. Das oxygenierte, inaktive Enzym jedoch kann durch jeden Prozeß reaktiviert werden, der den Sauerstoff entfernt.

Auch die Reaktivierung von Hydrogenasen allein durch Entfernung des Sauerstoffs mit Hilfe physikalischer Mittel ("Entgasung"), d.h. durch genügend lange anaerobe Inkubation, spricht für das Auftreten von Oxygenierungen. Eine solche Reaktivierung wurde u.a. bei den Hydrogenasen von P.vulgaris (HOBERMANN und RITTENBERG, 1943) und P.ruhlandii (BONE et al., 1963) gefunden. Die von PFITZNER et al. (1970) berichtete Aufhebung der NAD-Reduktionsanlaufphase nach Vorinkubation der löslichen Hydrogenase von H16 allein mit H_2 konnte in dieser Arbeit nicht bestätigt werden.

Eine große Rolle spielt bei vielen Hydrogenasen sicherlich auch die Oxidation von SH-Gruppen, die nicht nur eine unmittelbare Inaktivität bedingt, sondern in der Regel auch die Enzymstabilität erheblich beeinträchtigt. Enzyme, die auf diese Weise oxidiert werden, sind meist sehr sauerstoffempfindlich, sie können aber, da sie mit O_2 selbst keine Bindung eingehen, nicht durch Entfernung von Sauerstoff reaktiviert werden, sondern sind häufig auf die Gegenwart starker Reduktionsmittel angewiesen (vgl. Literaturhinweise zum Stabilitätsverhalten der Hydrogenasen). Cyanid, das auf oxygenierte Enzyme keinen Einfluß hat, vermag die Reaktivierung oxidierter Enzyme zu verhindern, wenn es dem Testansatz vor der Zugabe reduzierender Agenzien zugesetzt wird (FISHER et al., 1954).

Da die lösliche Hydrogenase von H16 über wahrscheinlich funktionelles Eisen verfügt, ebenso wie über eine oder mehr als eine freie SH-Gruppe, die für die Bindung des NAD verantwortlich ist, ist es wahrscheinlich, daß eine der beiden oder vielleicht sogar beide Mechanismen, die Oxidation von SH-Gruppen und die Oxygenierung, eine Rolle spielen.
Die Stabilität des inaktiven Enzyms, die Unempfindlichkeit gegenüber Sauerstoff und die Unabhängigkeit von Reduktionsmitteln sprechen eher dafür, daß das nicht reaktionsfähige Enzym oxygeniert vorliegt. Dennoch gibt es Indizien dafür, daß der inaktive Zustand der Hydrogenase auch, wenn nicht sogar entscheidend durch die Oxidation von SH-Gruppen verursacht wird:

1. Daß es nicht gelang, die hochgereinigte und von reduzierten, d.h. reaktivierenden Pyridinnucleotiden freie Hydrogenase allein durch Begasung mit molekularem Wasserstoff und anaerober Inkubation zu reaktivieren, wurde bereits erwähnt.
2. Die O_2-Unempfindlichkeit der Hydrogenase signalisiert einerseits, daß Sauerstoff nicht mit essentiellen SH-Gruppen reagiert, andererseits liegt es aber nahe anzunehmen, daß die Labilität der reduzierten Hydrogenase durch die Lösung einer strukturstabilisierenden Disulfid- oder Eisen-Schwefelbindung verursacht wird. Es könnte das Phänomen vorliegen, daß die

Oxidation von SH-Gruppen nicht, wie es der Normalfall ist, die Voraussetzung für die Denaturierung des Proteins schafft, sondern im Gegenteil das Enzym stabilisiert.

3. Die Hydrogenase wird durch Cyanid und Sulfid gehemmt, das oxidierte Enzym sichtbar stärker als das reduzierte (vgl. Kapitel 3.12.3.).
   Die von CMB ausgehende Hemmwirkung auf das reduzierte Enzym ist deutlich ausgeprägter als die auf das oxidierte.
   Beide Ergebnisse zeigen an, daß im oxidierten Enzymzustand eine Disulfidbindung oder eine Metall-Schwefelbindung existiert, die durch Reduktion gespalten wird. Eine Aussage über das Vorliegen freier SH-Gruppen beim nicht reaktiven Enzym kann nicht getroffen werden, weil das als "oxidiert" gekennzeichnete Enzym im Verlauf der Reaktion selbst reduziert wird und ein exaktes Hemmverhalten der oxidierten Hydrogenase daher nicht bestimmbar ist.

Da die Hydrogenase möglicherweise auch labilen Schwefel enthält, soll dieser anorganische Bestandteil vieler Eisen-Schwefel-Proteine als weiterer möglicher Angriffspunkt des Sauerstoffs nicht unerwähnt bleiben.
Die extreme Sauerstoffempfindlichkeit der Ferredoxine ist auf die Oxidation des labilen Schwefels zurückzuführen, die eine schnelle Zerstörung des Eisen-Sulfid-Zentrums zur Folge hat und zur Freisetzung von Eisen (PETERING et al., 1971) oder anorganischem Sulfid (KERESZTES-NAGY und MARGOLIASH, 1966) führen kann. Eine solche Enzym-Sauerstoff-Interaktion kann für die Hydrogenase aufgrund der Stabilität gerade des oxidierten Enzyms ausgeschlossen werden.
Wie ist nun der Vorgang der Reaktivierung vorstellbar?
Geht man davon aus, daß der reversiblen Inaktivierung der Hydrogenase eine Oxygenierung und/oder eine Oxidation von SH-Gruppen zugrunde liegt, so sind mindestens drei miteinander im Gleichgewicht stehende Enzymformen zu postulieren:

inakt., oxid. Enzym $\rightleftharpoons$ aktives, oxid. Enzym $\rightleftharpoons$ aktives, red. Enzy
(oxygen./SH-Gr. oxid.) (deoxygen./SH-Gr.red)

Unter "oxidiertem Enzym" wird zur Differenzierung gegenüber dem oxygenierten und dem SH-Gruppen-oxidierten Enzym dasjenige Enzym verstanden, dessen H_2-aktivierendes Zentrum oxidiert vorliegt. Das Gleichgewicht zwischen der inaktiven, oxidierten und aktiven, oxidierten Enzymform liegt weit auf der Seite der inaktiven Enzymform. Die wenigen, vorhandenen aktiven Enzymmoleküle reagieren mit H_2 und NAD und produzieren selbst ihren enzymeigenen Reaktivator NADH, der mit zunehmender Konzentration und in Gegenwart von H_2 ausreichende reduzierende Bedingungen schafft, um das inaktive Enzym in das aktive zu überführen, d.h. das Gleichgewicht zugunsten der aktiven, oxidierten Enzymform zu verschieben, die wiederum mit der reduzierten Enzymform im Gleichgewicht steht.
NAD, als Oxidant dem Reaktionsansatz in Substratmengen zugesetzt, begünstigt die inaktive Enzymform und verzögert den Reaktivierungsprozeß.
Der im Verlauf der NAD-Reduktion stattfindende Vorgang der Selbstaktivierung kann auch als Autokatalyse begriffen werden: Schon reduzierte Enzymmoleküle katalysieren die Reduktion bzw. die Reaktivierung weiterer Moleküle. Die Autokatalyse ist aber auf den Ablauf der eigentlichen Enzymreaktion (NAD-Reduktion) und der damit verbundenen steigenden NADH-Konzentration nicht angewiesen. Unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von H_2 und in Abwesenheit des zweiten Substrats NAD reichen geringste katalytische Mengen NADH aus, um den autokatalytischen Aktivierungsprozeß in Gang zu setzen.
An dieser Stelle muß erneut die Frage nach der Rolle, die NADH spielt, aufgegriffen werden. Zutreffend ist, wie zuvor schon aufgeführt, daß NADH nicht als Cofaktor bei der Katalyse der NAD-Reduktion fungiert. Denkbar wäre allerdings, daß es bei der autokatalytischen Reaktivierungsreaktion selbst die Rolle eines katalytisch funktionellen Cofaktors übernimmt. Dafür spricht, daß selbst die Gegenwart von Spuren dieser Verbindung hoch wirksam ist.
Folgender Reaktionsablauf ist vorstellbar: NADH reduziert die Disulfidbindung (Metall-Schwefel-Bindung) eines inaktiven En-

zymmoleküls; das entstehende NAD wird sofort von dem jetzt reaktionsfähigen Enzymmolekül wieder reduziert; mit Hilfe des Reaktionsprodukts wird das nächste Enzymmolekül aktiviert, das wiederum NADH regeneriert und an das nächste inaktive Enzymmolekül weitergibt usw.

2. Kinetische Eigenschaften

Die Aufnahme von Substratsättigungskurven zeigte, daß die kinetischen Eigenschaften der Hydrogenase davon abhängen, ob das oxidierte oder reduzierte Enzym für die Messungen eingesetzt wird bzw. davon, welchen Reduktionsgrad das Enzym zum Zeitpunkt der Aktivitätsbestimmung erreicht. Reduzierung der Hydrogenase und Gegenwart von NADH führen zu negativer Kooperativität, deren Ausprägung mit Erhöhung des Reduktionsgrades des Enzyms zunimmt. Das Auftreten negativer kooperativer Effekte äußert sich a) in einer hohen Enzym-Substrat-Affinität, die mit Zunahme der Substratkonzentration abnimmt, b) in einer aus der doppelt reziproken Auftragung resultierenden nach unten weisenden konkaven Kurve und c) in einem Hill-Koeffizienten, dessen Wert unter 1 liegt. Bei H_2-Sättigungskurven treten diese Merkmale deutlich, bei NAD-Sättigungskurven tendenziell auf, d.h. in erheblich abgeschwächter Form.
Im folgenden soll zu erläutern versucht werden, welches Phänomen der Erscheinung der negativen Kooperativität zugrunde liegt, die bislang noch bei keiner anderen Hydrogenase entdeckt und beschrieben worden ist, und welche Erläuterungsmöglichkeiten es für die bei der H_2-DH von H16 beobachteten Effekte gibt.

Wie bei der Reaktivierung der Hydrogenase, so spielen auch bei der negativen Kooperativität reduzierende Bedingungen und NADH die auslösende Rolle und wie es bei der Reaktivierung der Hydrogenase die Frage zu beantworten galt, ob NADH als Cofaktor benötigt wird, so stellt sich hier die Frage, ob NADH als posi-

tiver Effektor fungiert. Trotz der Tatsache, daß durch die Gegenwart von NADH das Enzym nicht nur reaktiviert wird, sondern auch die Affinität der Hydrogenase gegenüber den Substraten erhöht wird, muß diese Frage verneint werden. Abgesehen davon, daß eine durch das Endprodukt ausgeübte positive Effektorwirkung regulatorisch widersinnig wäre, konnte gezeigt werden, daß wie bei der Enzymreaktivierung nicht die Gegenwart des NADH selbst, sondern die Reduktion und der Reduktionsgrad entscheidend für die Enzym-Substrat-Affinität und für verändertes kinetisches Verhalten ist. Die Wirkung des NADH ist also nicht regulatorischer Natur in dem Sinn, daß es durch die Bindung an ein zweites, allosterisches Zentrum heterotrope Wechselwirkungen ausübt, sondern sie ist vielmehr als Wirkung aufzufassen, die aus der Funktion resultiert, die NADH als Reduktant und Reaktivator erfüllt und die parallel zur Enzymreduzierung und -reaktivierung auftritt.
Eine Konformations- oder Affinitätsänderung muß nicht auf die Wirkung allosterischer Effektoren zurückzuführen sein. Es leuchtet ein, daß die Deoxygenierung des H_2-aktivierenden Zentrums und/oder die Freisetzung funktioneller SH-Gruppen durch Reduktion die Affinität des Enzyms gegenüber den Substraten steigert. Eine mit der Enzymreduktion verbundene Konformationsänderung kann eine zusätzliche Rolle spielen.
Bevor nun auf die an der reduzierten Hydrogenase beobachtete negative Kooperativität selbst eingegangen wird, sollen zunächst die theoretischen Grundlagen dazu erörtert werden.

MONOD et al. (1965) gingen bei der Entwerfung ihres Symmetrie-Modells für allosterische Enzyme von der Existenz zweier Enzymzustände aus, dem inaktiven T-(=tense) und dem reaktionsbereiten R-(=relaxed) Zustand, die miteinander im Gleichgewicht stehen. Da alle Untereinheiten des Enzyms nur identisch beeinflußt werden, bleibt die Symmetrie der beiden Konformationen stets erhalten, es existieren keine Zwischenzustände. Allein Enzymmoleküle des R-Zustandes sind dazu in der Lage, positive Effektoren und Substrate zu binden. Inhibitoren werden von der

inaktiven Enzymkonformation gebunden. Werden dem Gleichgewicht Enzymmoleküle des R-Zustandes z.B. durch Substratbindung entzogen, so werden diese aus den Molekülen des T-Zustandes sofort nachgebildet. Da dies bedeutet, daß mit steigender Substratkonzentration eine Verschiebung des Gleichgewichts zugunsten des aktiven Enzymzustandes erfolgt, also stets die Affinität des Enzyms zum Substrat erhöht, niemals vermindert wird, kann mit Hilfe dieses Enzymmodells allein positive, nicht aber negative Kooperativität erklärt werden.
Demgegenüber postuliert das "sequentielle" Modell von KOSHLAND et al. (1966) den "ligandeninduzierten Konformationswechsel". Wird z.B. ein Substratmolekül durch eine Enzymuntereinheit gebunden, so führt diese Bindung zu einer Konformationsumwandlung des Enzyms und damit zu einer veränderten Affinität gegenüber dem zweiten Substratmolekül. Die Bindung des zweiten Substratmoleküls induziert wiederum einen Konformationswechsel usw. Dabei ist die durch den Konformationswechsel bedingte Affinitätsänderung nicht gleichbedeutend mit Erhöhung der Affinität, sondern die Bindung eines Substratmoleküls kann in einem Fall die Bindung des nächsten Substratmoleküls erleichtern (positive Kooperativität) und im anderen Fall die Bindung erschweren (negative Kooperativität). Es ist sogar denkbar, daß sich bei einem einzigen Enzym während der Substratsättigung positive und negative Kooperativität abwechseln, wenn etwa die Bindung des ersten Substratmoleküls die Affinität zum zweiten Molekül erhöht, die Bindung des zweiten Moleküls aber die Affinität zum dritten Substratmolekül wieder vermindert.
Die Untereinheiten werden also nicht identisch, sondern "sequentiell" beeinflußt und je nach Anzahl der Untereinheiten können mehrere Enzymzustände, einschließlich asymmetrischer Hybride, auftreten. Ein inaktiver Zustand existiert nicht.

Das "sequentielle" Modell basiert auf der schon 1958 von KOSHLAND aufgestellten "induced fit"-Theorie zur Erklärung der Enzymspezifität. Sie postuliert, daß die Enzymreaktion erst stattfinden kann nach einem durch das Substrat selbst induzierten Proteinstrukturwechsel.

Positive Kooperativität, zuerst von BOHR et al. (1904) am Hämoglobin beobachtet, galt lange Zeit als die einzige Form der Wechselwirkung zwischen identischen Liganden.
Negative Kooperativität ist erst 1968 von CONWAY und KOSHLAND an der Glycerinaldehyd-3-phosphat-DH entdeckt und beschrieben worden. Sie galt anfangs als ein seltenes Ereignis, ist inzwischen aber bei vielen Enzymen, häufig auch im Wechsel mit positiver Kooperativität auftretend, gefunden worden. Letzteres führt bei starker Ausprägung zu den sogenannten "bumpy curves", d.h. zu zwei- oder mehrphasigen Sättigungskurven mit dazwischenliegenden Plateaus, wie sie von TEIPEL und KOSHLAND (1969) u.a. am Beispiel der CTP-Synthetase (E.coli) analysiert worden sind.

Negative Kooperativität bietet für die betroffenen Enzyme den Vorteil, gegenüber Substratkonzentrationsveränderungen unempfindlich zu sein. Hohe Substrataffinität bei niederen Substratkonzentrationen und abnehmende Affinität mit steigender Substratkonzentration gewährleisten weitgehend unabhängig von der Substratkonzentration eine nahezu konstante Aktivität. Dies kann für einige Enzyme, gerade für solche, die im Dienst der Energiegewinnung stehen, von großer Bedeutung sein.
Es wurde zuvor ausgeschlossen, daß NADH als allosterischer Effektor eine regulatorische Funktion erfüllt. Es soll nun der Frage nachgegangen werden, ob die Substrate selbst, insbsondere H_2, eine solche Funktion erfüllen, d.h. ob sich die bei der löslichen Hydrogenase beobachtete negative Kooperativität auf substratinduzierte Konformationsänderungen begründen läßt, oder ob es andere mögliche Erklärungen gibt.
Als Tatsache gilt es zu konstatieren, daß die Kinetiken der im physiologischen, aktiven Zustand vorliegenden Hydrogenase alle Kennzeichen negativer Kooperativität aufweisen. Den Ausführungen von LEVITZKY und KOSHLAND (1969) zufolge müssen negative kooperative Effekte jedoch nicht zwingend notwendig auf der regulatorischen Funktion eines Liganden basieren. Sie können auch durch folgende andere molekulare Ereignisse hervorgerufen werden:

1. Durch das Vorliegen von Isoenzymen. Dieser Fall trifft für die Hydrogenase sicher nicht zu, wie mit Hilfe gelelektrophoretischer Analyse nachgewiesen werden konnte.
2. Durch das Vorliegen zweier oder mehrerer polymorpher Formen desselben Enzyms.
   Das Auftreten der unter Punkt 1. und 2. angeführten Ereignisse täuscht kooperative Effekte nur vor, weil die für negative Kooperativität übliche Definition, nach der die Bindung eines Liganden die Bindung des nächsten Liganden erschwert, nicht zutrifft. Zwar nimmt auch hier mit steigender Konzentration des Liganden die Affinität gegenüber diesem Liganden ab, die Affinität ist aber nicht von Untereinheit zu Untereinheit innerhalb eines Enzymmoleküls verschieden, sondern lediglich von Enzymform zu Enzymform.
3. Durch elektrostatische Abstoßungen zwischen den Liganden.
4. Durch nicht identische Untereinheiten mit aktiven Zentren, deren Bindungskonstanten für den Liganden sich unterscheiden. Diese Möglichkeit gewinnt für die Hydrogenase an Bedeutung, weil sie aus mehreren, zumindest aber aus zwei nicht identischen Untereinheiten besteht. Sind die nicht identischen Untereinheiten tatsächlich Ursache für die beobachteten kooperativen Effekte, so stellt sich die Frage, wie es erklärbar ist, daß oxidiertes bzw. nicht vollständig reduziertes Enzym keine oder geringer ausgeprägte Kooperativität aufweist. Es wäre denkbar, daß diejenigen Untereinheiten, die eine stärkere Affinität zu den Substraten haben, auch gegenüber Sauerstoff als Reaktionspartner eine höhere Affinität besitzen und daher schwerer reduzierbar sind, d.h. die stärkere Enzym-Substrat-Affinität dieser Untereinheiten wird durch ihren geringeren Reduktionsgrad aufgehoben bzw. vermindert.
5. Durch Enzymuntereinheiten, deren Bindungskonstanten zwar ursprünglich nicht voneinander verschieden sind, die aber geometrisch so angeordnet sind, daß sie nicht identische Bindungsstellen erzeugen.

Trotz dieser alternativen Möglichkeiten ist dennoch nicht auszuschließen, daß die kooperativen Effekte der Hydrogenase al-

lein auf substratinduzierten Konformationsänderungen beruhen. Denkbar ist aber auch die Kombination zweier oder mehrerer der genannten Möglichkeiten.

3. Acceptorspezifität

Die Acceptorspezifität ist eine der wichtigsten Kriterien zur Differenzierung von Hydrogenasen. Dies wird deutlich beim Vergleich der spezifischen, physiologischen Acceptoren (Donatoren) der verschiedenen Hydrogenasen: Die Hydrogenasen der Clostridien gelten als ferredoxinabhängig und werden daher auch Wasserstoff-Ferredoxin-Oxidoreduktasen genannt (VALENTINE et al., 1963). Der Hydrogenase von Desulfovibrio vulgaris wurden aufgrund ihrer Cytochrom c_3-Abhängigkeit der Name Wasserstoff-Cytochrom c_3-Oxidoreduktase gegeben (TAMIYA et al., 1966). Die löslichen Hydrogenasen von P.ruhlandii (PACKER und VISHNIAC, 1955; BERNSTEIN und VISHNIAC, 1959), A.eutrophus H16 (PFITZNER et al., 1970) und N.opaca 1b (AGGAG und SCHLEGEL, 1974) werden als NAD-spezifisch angesehen und daher H_2-Dehydrogenasen genannt. Erst kürzlich wurde von TZENG et al. (1975) eine Faktor 420-abhängige NADP-gebundene Hydrogenase von Methanobacterium ruminantium beschrieben.
Für viele Hydrogenasen ist der spezifische, physiologische Acceptor noch nicht eindeutig nachgewiesen oder ist sogar noch völlig unbekannt; das gilt vor allem für die partikulären Hydrogenasen der Wasserstoffbakterien. Die häufig beobachtete Fähigkeit von Rohextrakten, eine Vielfalt von physiologischen und künstlichen Wasserstoffacceptoren reduzieren zu können (JOKLIK, 1950; KINSKY, 1959; BULLER und AKAGI, 1964 u.a.), läßt keine wirkliche Aussage über die Acceptorspezifität der jeweiligen Hydrogenase zu, da in unreinen Enzympräparaten, die neben zugesetzten Acceptoren auch noch zelleigene Elektronenüberträger enthalten, eine Reaktionsfolge über zwei oder mehrere Schritte und die Beteiligung von Zweit- und Drittenzymen nicht ausgeschlossen werden kann.

Aus diesem Grund muß der Vergleich der Hydrogenasen nach ihrer Acceptorspezifität im wesentlichen auf Enzyme begrenzt bleiben, die im gereinigten oder zumindest teilweise gereinigten Zustand untersucht worden sind.

Es soll zunächst der Frage nachgegangen werden, wie stark die Acceptorspezifität gerade derjenigen Hydrogenasen ausgeprägt ist, die in vivo von spezifischen Elektronenüberträgern abhängig sind oder als abhängig gelten.
Der natürliche physiologische Acceptor/Donator der Hydrogenase von C.pasteurianum ist Ferredoxin. Dennoch vermag das reine Enzym auch in Abwesenheit von Ferredoxin künstliche Redoxfarbstoffe wie MB, MV und BV zu reduzieren (CHEN und MORTENSON, 1974).

Auch die Hydrogenase von D.vulgaris ist dazu befähigt, MB und BV direkt umzusetzen (HASCHKE und CAMPBELL, 1971), FAD und FMN dagegen werden nur in Gegenwart von Cytochrom c_3 reduziert, NAD und MV gar nicht.
Eine strengere Acceptorspezifität wurde für die H_2-Dehydrogenasen der Knallgasbakterien gefunden. PACKER und VISHNIAC (1955) folgerten aus ihren Untersuchungsergebnissen, daß für die Reduktion der von NAD verschiedenen H-Acceptoren durch die Hydrogenase von P.ruhlandii die Gegenwart von katalytischen Mengen NAD notwendig ist und stellten die für die lösliche Hydrogenase von H16 von PFITZNER et al. (1970) bestätigte These auf, daß sich die NAD-Reduktion als Primärreaktion in einem Schritt vollzieht, die Reduktion von Farbstoffen und anderen Verbindungen aber in zwei oder sogar mehreren Reaktionsschritten. Dies bedeutet, daß NAD alleiniger und spezifischer H-Acceptor des Enzyms ist und daß alle anderen von NAD verschiedenen Acceptoren nicht direkt mit der Hydrogenase reagieren können, sondern auf NAD als Elektronenzwischenüberträger angewiesen sind.
Diese These wird durch die Untersuchungsergebnisse dieser Arbeit gänzlich umgestoßen. Es konnte stichhaltig nachgewiesen und mit Hilfe des Einsatzes strukturanaloger Verbindungen von NAD(H) ausreichend abgesichert werden, daß die Reduktion der von NAD verschiedenen Acceptoren keine Sekundärreaktion ist, der die

NAD-Reduktion als Primärschritt vorausgeht, sondern sie erfolgt direkt und stellt einen von der NAD-Reduktion völlig unabhängigen Reaktionsablauf dar.
Da das oxidierte Enzym nicht reaktionsfähig ist und erst in die physiologische, aktive Form umgewandelt werden muß, in Gegenwart der von NAD verschiedenen Oxidanten aber keine Selbstaktivierung des Enzyms durch schon gebildete, reduzierte Substratmoleküle stattfindet, ist in diesen Fällen der direkte Zusatz reduzierender Verbindungen in den Testansatz erforderlich oder der Einsatz des schon zuvor reduzierten Enzyms.
NAD, bislang als diejenige Verbindung angesehen, von der die Reduktion anderer Verbindungen abhängt, täuscht nur vor, essentiell zu sein. In Wirklichkeit wird NAD durch die Hydrogenase erst in die eigentlich wirksame Verbindung NADH umgesetzt. NAD selbst spielt eine vollständig unwesentliche Rolle, ja es beeinträchtigt sogar die Affinität des Enzyms gegenüber H_2.
Aber auch auf die Gegenwart von NADH ist der Reaktionsablauf nicht angewiesen; maßgebend sind vielmehr alle reduzierenden Verbindungen und Reaktionsbedingungen (UV-Einwirkung, NADH, NADH-Strukturanaloge, Reduktionsmittel), die die reaktivierende Funktion erfüllen.
PFITZNER et al. (1970) charakterisierten die lösliche Hydrogenase als NAD-spezifisch. Die hier geschilderten Befunde werfen aber die Frage auf: Wie NAD-spezifisch ist die Hydrogenase wirklich?
Folgende Faktoren sprechen dafür, daß NAD in der Tat der natürliche, physiologische Wasserstoff- und Elektronenacceptor ist:

1. NAD ist die einzige Verbindung, die ohne Zusätze und äußere Eingriffe (Schaffung reduzierender Bedingungen) aufgrund eines parallel zur Reaktion verlaufenden Selbstaktivierungsprozesses reduziert wird. Offenbar wird durch die anderen Oxidanten, ebenso wie durch NAD selbst, nur in noch einschneidenderer Weise, die inaktive Enzymform der Hydrogenase begünstigt. Während NAD die Reaktivierung lediglich verzögert, wird sie durch Einwirken der anderen Oxidanten ganz verhindert.

2. Schon 1961 wurde von KING berichtet, daß künstliche Elektronenacceptoren häufig nicht unterscheiden können zwischen physiologisch aktivem Enzym und einem Enzym, das schon z.B. durch präparationsbedingte Modifikation inaktiviert ist. Dies entspricht auch folgender bei der H16-Hydrogenase gemachten Beobachtung: Die durch Reduktion hervorgerufene Labilität des Enzyms kann eine sehr schnell eintretende, teilweise Denaturierung zur Folge haben, die zum Verlust der NAD-reduzierenden Aktivität führt, aber keinen Einfluß hat auf die Aktivität, die mit anderen Acceptoren erzielt wird. Daraus ist zu schließen, daß die Hydrogenase eine Bindungsstelle besitzt, die allein für NAD spezifisch ist.

Um die Acceptorspezifität der Hydrogenase aber richtig einschätzen und beurteilen zu können, gilt es, auch folgende Gegenargumente zu bedenken:

1. Die Hydrogenase ist in vivo nicht auf den hier dargestellten Prozeß der Selbstaktivierung angewiesen: In der Zelle stehen dem Enzym immer geringe Mengen NADH zur Verfügung, deren Bindung nicht nur die Reaktivität der Hydrogenase gewährleistet, sondern überdies die Affinität insbesondere gegenüber H_2 noch erheblich steigert. In der Konsequenz bedeutet das, und das ist auch der eigentlich spektakuläre Inhalt dieser Untersuchungsergebnisse, daß die lösliche Hydrogenase nicht nur mit NAD, sondern mit sämtlichen Komponenten der Atmungskette direkt reagieren kann und demzufolge dazu in der Lage ist, den aktivierten Wasserstoff an jeder beliebigen Stelle in den Elektronentransport einzuschleusen.
2. Ein weiteres herausragendes Ergebnis der Untersuchungen, die im Zusammenhang mit der Erforschung der Hydrogenase-Acceptorspezifität durchgeführt wurden, ist die Entdeckung einer der Hydrogenase zuzuordnenden Diaphoraseaktivität, die sich auf eine ebenfalls nachgewiesene Flavinkomponente gründet, die die Hydrogenase als prosthetische Gruppe gebunden hält.

Mit Hilfe von NADH und NADPH als H-Donatoren konnte ebenfalls eine Vielzahl von Wasserstoffacceptoren und Elektronenüberträgern reduziert werden.

Angesichts solcher Potenzen, die der Hydrogenase eigen sind, erscheint die Anwendung des Begriffs "NAD-spezifisch", wenn überhaupt, nur mit äußerster Einschränkung gerechtfertigt.

Die Identität bzw. das nahezu identische Ausmaß der Raten der hydrogenase- und diaphoraseabhängigen Reaktion signalisiert, daß die Wasserstoffübertragung geschwindigkeitsbestimmender Schritt ist und bei beiden Reaktionen nach demselben Mechanismus abläuft, d.h. sowohl der H_2-aktivierte als auch der NAD(P)H-Wasserstoff wird durch Vermittlung des Flavins, das als enzymgebundener Zwischenüberträger fungiert, auf die entsprechenden Acceptoren übertragen.
Die Beteiligung des Flavins an der Enzymkatalyse ist daher nicht nur verantwortlich für die Diaphorase- und die NAD(P)H-oxidase-Aktivität, sondern auch für die hydrogenaseabhängigen Aktivitäten und die sehr geringe Acceptorspezifität der Hydrogenase insgesamt. Zwar werden die Oxidanten vom Apoprotein gebunden, das Flavin ist aber diejenige Verbindung, die als Cofaktor erst die Wasserstoff- und Elektronenübertragung auf eine große Anzahl von Acceptoren ermöglicht.
DIXON untersuchte 1971 vergleichend die Acceptorspezifität von 20 verschiedenen Flavoproteinen und stellte fest, daß sich 1. alle Enzyme in ihrer Spezifität gegenüber den verschiedenen Acceptoren voneinander unterscheiden, daß sich aber 2. trotzdem alle durch geringe Spezifität auszeichnen.
Betrachten wir auch die Hydrogenase ganz generell als Flavoprotein, so stellt die geringe Acceptorspezifität weniger eine Überraschung, als vielmehr ein Charakteristikum dar.

In der Literatur wurden bislang voneinander verschiedene NAD-Reduktionsmechanismen diskutiert. Im Mittelpunkt stand stets die Frage, in wievielen Schritten NAD reduziert wird, und ob Flavinnucleotide in den Reaktionsablauf eingeschaltet sind oder nicht.
Die NAD-Reduktion durch die löslichen Hydrogenasen von P.ruhlandii (BERNSTEIN und VISHNIAC, 1959), P.saccharophila (BONE, 1963) und H16 (PFITZNER et al., 1970) wurden bisher als flavinunab-

hängig angesehen. WITTENBERGER und REPASKE (1961) forderten dagegen für die NAD-Reduktion der Hydrogenase von A.eutrophus (ATCC 17697) mindestens eine Zweistufenreaktion. REPASKE (1962) ermittelte für dasselbe Enzym FMN als essentiellen Cofaktor, der die NAD-Reduktion je nach Extraktpräparation und Testbedingungen bis zu 15fach stimuliert. REPASKE und DANS (1968) ließen jedoch die Frage offen, ob FMN wirklich eine physiologische oder eine künstliche Kopplerfunktion erfüllt.
Die in dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Untersuchungen an den Hydrogenasen verschiedener A.eutrophus-Stämme zeigten, daß die FMN-Wirkung auf die verschiedenen Hydrogenasen sehr unterschiedlich stark war. Diese Ergebnisse, ebenso wie der Nachweis, daß eine Flavinkomponente Bestandteil der H16-Hydrogenase ist, führen zu dem Schluß, daß offensichtlich die NAD-Reduktion bei den verschiedenen Knallgasbakterien nach dem gleichen Mechanismus abläuft, daß nämlich jeweils ein Flavin (wahrscheinlich FMN) als Elektronenvermittler in den Reaktionsablauf eingeschaltet ist. Einziges Unterscheidungsmerkmal scheint lediglich die Bindungsfestigkeit des Flavins zu sein. Während die H16-Hydrogenase, und es ist anzunehmen, auch die Hydrogenasen von P.ruhlandii und P.saccharophila, das Flavin als prosthetische Gruppe fest an das Apoprotein gebunden halten, fungiert es bei einigen A.eutrophus-Stämmen offenbar als dissoziables Coenzym.
Dieses Beispiel verdeutlicht einmal mehr, daß die geringe Wirkung oder Wirkungslosigkeit zugesetzter Cofaktoren keinesfalls, wie in den Fällen der H_2-Dehydrogenasen von H16, P.saccharophila und P.ruhlandii geschehen, zu der pauschalen und vorschnellen Aussage führen darf, das Enzym sei cofaktorbedürfnislos. Dies gilt gerade für Dehydrogenasen, von denen bekannt ist, daß sie in den meisten Fällen Flavin, sofern es eine funktionelle Rolle spielt, fest gebunden halten (LEHNINGER, 1970).

Es kann allerdings auch der seltene Fall eintreten, daß fest gebundenes Flavin gar keine katalytische Funktion erfüllt. YOSHIDA und NAKAMURA (1973) demonstrierten an der Luciferase von Photobacterium phosphoreum, daß die Abtrennung von p-Flavin

nicht zu einer Beeinträchtigung der Enzymaktivität führt. Die essentielle Rolle, die FMN als Coenzym bei Hydrogenasen verwandter H16-Stämme spielt, ist ein hinreichendes Indiz dafür, daß die Möglichkeit, das Flavin der H16-Hydrogenase sei an der NAD-Reduktion unbeteiligt, nicht in Betracht zu ziehen ist.

Die Beteiligung von Flavinnucleotiden an der H_2-abhängigen Reduktion von NAD ist auch von Rhodospirillum rubrum (BOSE und GEST, 1962) und C.kluyveri (KINSKY et al., 1961) berichtet worden. In beiden Fällen war die Gegenwart von FMN (R.rubrum) bzw. FAD (C.kluyveri) für den Ablauf der Reaktion notwendig. Da jedoch nur mit zellfreien Extrakten gearbeitet wurde, ist es eher wahrscheinlich, daß die NAD-Reduktion nicht durch die ferredoxinabhängigen Hydrogenasen selbst, sondern durch ein zweites oder drittes Enzym katalysiert wurde.

4. Einordnung der Hydrogenase als Eisenprotein

In vielen Arbeiten wurde die Hydrogenase aufgrund ihrer Hemmbarkeit durch Schwermetallgifte für ein metall-, meist eisenhaltiges Enzym gehalten (vgl. Ausführungen in Kapitel 3.12.3.). Dem Eisen (Metall) wurde und wird die Funktion zugeschrieben, bei der Bindung und Aktivierung des molekularen Wasserstoffs die zentrale Rolle zu spielen (RITTENBERG, 1957; KLEINER und BURRIS, 1970; MORTENSON und CHEN, 1974).
Da keine gereinigten Enzyme zur Verfügung standen und man sich lediglich auf Hemmstudien, nicht auf spektrophotometrische Untersuchungen stützen konnte, wurde in den ersten Jahren der Hydrogenaseforschung, noch vor der Entdeckung der Eisen-Schwefelproteine, geglaubt, das Eisen der Hydrogenase sei porphyringebunden (HOBERMANN und RITTENBERG, 1943; SAN PIETRO, 1955). Erst 1971 wurde Eisen in den Hydrogenasen von D.vulgaris und C.pasteurianum erstmals definitiv nachgewiesen und auch quantitativ bestimmt (LEGALL et al. 1971; NAKOS und MORTENSON, 1971b). Die Hydrogenase von D.vulgaris enthält vier Eisenatome, die Hydrogenase von C.pasteurianum nach neuesten Informa-

tionen 12 Eisenatome pro Enzymmolekül (CHEN und MORTENSON, 1974). Das EPR (electron paramagnetic resonance)-Spektrum beider Enzyme zeigt ein Signal im Bereich um g=1,94, das typisch ist für Eisen-Schwefel-Proteine vom Ferredoxin-Typ (BEINERT, 1965).
Die Eisenhaltigkeit der löslichen Hydrogenase von H16 konnte durch die charakteristische Lichtabsorption im sichtbaren Wellenlängenbereich demonstriert werden. Ist eine endgültige Identifikation und Typisierung der Hydrogenase als Eisenprotein auch noch nicht möglich, weil noch wichtige quantitative Bestimmungen von Eisen, SH-Gruppen und labilem Schwefel sowie vor allem die Aufnahme eines EPR-Spektrums ausstehen, so soll doch im folgenden der Versuch einer tendenziellen Einordnung unternommen werden.
Wie sind die Eisenproteine* zu klassifizieren? Sie lassen sich zunächst in die beiden Grundtypen der Hämeisenproteine und Nichthämeisenproteine einteilen. Während die Hämeisenproteine eine recht einheitliche Klasse von Proteinen bilden, die charakterisiert sind durch die Gebundenheit des Eisens an eine prosthetische Hämgruppe und das dadurch bedingte Absorptionsspektrum mit in der Regel deutlich ausgeprägten und signifikanten Banden um 550 und 420 nm, ist dagegen die Klasse der Nichthämeisenproteine (nonheme iron-Proteine = NHI-Proteine) sehr heterogen, weil sie ausnahmslos alle Proteine einschließt, die Eisen enthalten, das nichthämgebunden ist. Zwar können diese Proteine auch in ihrem Absorptionsverhalten sehr differieren, das Gesamterscheinungsbild ihrer Spektren, die breite, ausgedehnte und in Richtung niederer Wellenlängen (400-300 nm) ansteigende Absorption ist aber ähnlich und von der der Hämeisenproteine leicht unterscheidbar.
Das in Kapitel 3.11.1. ausführlich dargestellte Absorptionsspektrum der löslichen Hydrogenase von H16 weist dieses Enzym eindeutig als NHI-Protein aus.

---

* Die Zusammenstellung und Beschreibung der Eisenproteine wurde im wesentlichen den Büchern folgender Titel entnommen: "Nonheme iron proteins" (SAN PIETRO, 1965) und "Iron-sulfur proteins", Bände I und II (LOVENBERG, 1973).

Schwieriger gestaltet sich die Zuordnung der Hydrogenasen innerhalb der Klasse der NHI-Proteine. Die größte und am besten untersuchte Gruppe ist die der Eisen-Schwefel-Proteine (Fe-S-Proteine), die sich selbst wieder in vier Untergruppen (Ferredoxine, Rubredoxine, HIPIP-Proteine, konjugierte Fe-S-Proteine) gliedert.
Zu den Fe-S-Proteinen gehören nur die Proteine, bei denen der Schwefel Ligand des Eisens ist und das Eisen nicht gleichzeitig an weitere Liganden fester als an Schwefel gebunden ist. An der Bindung mit Schwefel ist in der Regel sowohl eine oxidierte SH-Gruppe des Cysteins, als auch säurelabiler Schwefel (anorganisches Sulfid) beteiligt. Die Beteiligung von labilem Schwefel ist zwar ein Charakteristikum der Fe-S-Proteine, aber nicht obligatorisch.

Die Ferredoxine sind die Vertreter der größten und zugleich prototypischen Gruppe der Fe-S-Proteine. Es gibt Ferredoxine, die 8,4 und 2 Fe-S-Komplexe enthalten. Die Molekulargewichte liegen zwischen 6 und 13 000 Dalton. Als Urferredoxin wird aufgrund ihres einfachen Baues die halbe Peptidkette der 8 Fe-Ferredoxine der Clostridien angesehen (HALL et al., 1974). Die 4 Fe-Ferredoxine dagegen stellen schon eine Verbindungsstufe zwischen dem Urferredoxin und den 2 Fe-Ferredoxinen dar, die auch im pflanzlichen und tierischen Organismus weit verbreitet sind.

Die Rubredoxine anaerober Bakterien (Clostridien) enthalten nur ein Eisenatom und keinen labilen Schwefel. Das Eisen ist an 4 Cysteinschwefelatome gebunden. Die Molekülgröße entspricht der der Ferredoxine.

Die HIPIP (high potential iron proteins)-Proteine (MG um 10 000) sind bei photosynthetischen Bakterien gefunden worden und ähneln sehr den 4 Fe-Ferredoxinen. Sie zeichnen sich allerdings durch ein hohes Redoxpotential und eine hohe Bindungsfestigkeit des Eisens aus.

Hochmolekulare Enzyme, die schwefelgebundenes Eisen enthalten, werden nach der 1973 für Fe-S-Proteine aufgestellten Nomenklatur durch die IUPAC-IUB-Commission on Biochemical Nomenclature (u.a. in: Biochim. Biophys. Acta, 310, 295-297) als konjugierte Fe-S-Proteine klassifiziert, weil sie neben dem Fe-S-Zentrum in der Regel weitere elektronenübertragende Komponenten (Molybdän, Flavin oder beide Bestandteile zugleich) enthalten und dadurch über einen eigenen, internen Elektronentransport verfügen.
In der Evolution dürften die konjugierten Fe-S-Proteine einerseits eine Vorstufe zu komplexeren Elektronentransportsystemen dargestellt haben und andererseits die Weiterentwicklung der einfachen Ferredoxine, die allein das Fe-S-Zentrum als Basiseinheit der Elektronenübertragung enthalten (HALL et al., 1974). Das komplexeste Fe-S-Enzym ist die Aldehyd-Oxidase, die neben Eisen, Molybdän und FAD auch noch Coenzym Q_{10} als weitere prosthetische Gruppe enthält (RAJAGOPALAN und HANDLER, 1964). Hemmstudien am Enzym aus Kaninchenmuskel ergaben, daß die Reduktion des Sauerstoffs bzw. der Elektronentransport vom Substrat zum O_2 durch eine Folge von vier enzymeigenen carriern erfolgt.

Weniger komplex sind die verschiedenen flavinhaltigen Dehydrogenasen (NADH-DH, Succinat-SH, Xanthin-DH u.a.), die aber ebenfalls meist mit Hilfe mehrerer Substrate eine große Anzahl von Elektronenacceptoren reduzieren können.
Auch die Hydrogenase von H16 entpuppte sich als multifunktionelles Enzym, das neben der eigentlichen Hydrogenaseaktivität auch Diaphorase- und NAD(P)H-oxidase Aktivität besitzt. Es drängt sich daher geradezu auf, die Hydrogenase der Gruppe der konjugierten Fe-S-Proteine zuzuordnen, weniger wegen einzelner Merkmale, als vielmehr wegen des Gesamtcharakters des Enzyms als NHI-Protein, d.h. wegen der Komplexität und der Universalität der Hydrogenase hinsichtlich ihrer Funktionen und Fähigkeiten.
Hydrogenasen wurden früher häufig als Metalloflavoproteine eingeschätzt (SHUG et al., 1954; PACKER und VISHIAC, 1955 u.a.). Nachdem aber weder für die angereicherten H_2-DH von P.ruhlandii

und H16 (BONE, 1963; PFITZNER et al., 1970), noch für die homogen gereinigten Hydrogenasen von D.vulgaris und C.pasteurianum (LEGALL et al., 1971; CHEN und MORTENSON, 1974) ein Flavin als Enzymbestandteil nachgewiesen werden konnte, ist diese Frage wieder außer Diskussion geraten. In dem kürzlich von MORTENSON und CHEN (1974) publizierten Review über Hydrogenasen ist nicht einmal die Möglichkeit erwähnt, daß die Hydrogenasen neben funktionellem Eisen auch ein Flavin als zusätzlichen Elektronencarrier enthalten könnten.

Vor diesem Hintergrund erscheinen der jetzt erstmalig erfolgreich geführte Flavinnachweis, ebenso wie die bei Hydrogenasen vorher nicht beschriebenen multifunktionellen Eigenschaften und Fähigkeiten des H16-Enzyms als außergewöhnliche und einschneidende Befunde. Und dennoch: Da die konjugierten Proteine innerhalb der Fe-S-Proteine die für Enzyme einzige klassifizierte Gruppe ist, ist die Zugehörigkeit eines Enzyms zu den Fe-S-Proteinen, und die weitaus meisten aller Eisenenzyme gehören zu dieser Proteingruppe, allein schon indikativ für Flavinhaltigkeit und Komplexität des jeweiligen Enzyms. Multifunktionelle Eigenschaften von Eisenenzymen sind daher nicht exzentrischer Natur, sondern sogar ein Gruppenmerkmal. Von dieser Warte aus gesehen ist weniger die Identifizierung der H16-Hydrogenase als konjugiertes, multifunktionelles Eisenprotein eine Überraschung als vielmehr das Fehlen von Flavin und Molybdän bei den Hydrogenasen von D.vulgaris und C.pasteurianum.

Offensichtlich verkörpern die Hydrogenasen der anaeroben Bakterien diejenigen Enzyme, die den Ferredoxinen am nächsten stehen. Wahrscheinlich stellen sie eine Zwischenstufe zwischen den schon höher entwickelten 2 Fe-Ferredoxinen der Pflanzen und Tiere und den komplexen Fe-S-Proteinen dar. Tatsächlich stellten MULTANI und MORTENSON (1972) beim Vergleich der Hydrogenase von C.pasteurianum mit Spinatferredoxin und Adrenodoxin (Nebennierenferredoxin) fest, daß viele Banden des Zirkulardichroismus-Spektrums dieser drei Proteine ähnlich sind und auf strukturelle Übereinstimmungen schließen lassen.

Die von den Fe-S-Proteinen verschiedenen NHI-Enzyme sind vergleichsweise unbedeutend. Sie lassen sich nicht einmal klassifizieren, sondern lediglich anhand von Einzelbeispielen darstellen. Bevor jedoch die Identität der Hydrogenase als Fe-S-Protein nicht 100%ig durch die g=1,94 EPR-Absorption nachgewiesen ist, ist zumindest nicht auszuschließen, daß die Hydrogenase doch einem der anderen Eisenprotein-Typen entspricht, die im folgenden ebenfalls kurz vorgestellt werden sollen.

Die Dioxygenasen sind als NHI-Proteine bekannt, die sich von ferredoxintypischen Fe-S-Proteinen hinsichtlich ihrer Funktion und anderen Eigenschaften stark unterscheiden. Sie enthalten keinen labilen Schwefel, kein Flavin oder andere prosthetische Gruppen, ihr EPR-Spektrum zeigt ein Signal um g=4,3 (NOZAKI, 1974). Mit Hilfe hemmstoffanalytischer Untersuchungen konnte aber NAGAMI (1972) aufzeigen, daß das Eisen dieser Enzyme wahrscheinlich auch an Schwefel (Cysteinschwefel) gebunden ist. Demnach würden die Dioxygenasen zwar nicht zu den Fe-S-Proteinen vom Ferredoxintyp, aber im weitesten Sinn dennoch zu den Fe-S-Proteinen zu rechnen sein.
Das Eisen des Transferrins, einem Fe^{3+}-übertragenden Protein des Blutplasmas, ist chelatartig an drei Tyrosin-OH-Gruppen und an zwei unprotonierte Stickstoffatome von Histidin-Imidazolgruppen gebunden (AASA et al., 1963).
VILLAFRANCA und MILDVAN (1971) nahmen an, daß das Eisen der Aconitase aus Schweineherzmuskel auf ähnliche Weise gebunden ist wie das Transferrineisen und keine katalytische, sondern eine strukturstabilisierende Funktion erfüllt.
Als letzter NHI-Protein-Typ sei die Ribonucleotid-Reduktase von E.coli erwähnt (BROWN et al., 1968). Das Eisen dieses Enzyms ist katalytisch funktionell, aber locker gebunden und leicht dissoziabel. Die Art der Bindung des Eisens ist nicht bekannt. Anorganisches Sulfid konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die kleine aber scharfe Absorptionsbande bei 410 nm ist ein für NHI-Proteine sonst untypisches Merkmal.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Mit Hilfe schonender Zellaufschlußmethoden und diskontinuierlicher Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation konnten die Hydrogenasen der Stämme Pseudomonas facilis, Paracoccus denitrificans, Corynebacterium autotrophicum 7c und 14g als ausschließlich partikelgebunden identifiziert und charakterisiert werden.

2. Keine der partikulären Hydrogenasen war dazu in der Lage, NAD(P) zu reduzieren. Mit Lysozymextrakten von P.denitrificans konnte jedoch eine energieabhängige NAD-Reduktion demonstriert werden. Extrem hohe Aktivitäten wurden mit Methylenblau als Wasserstoffacceptor erzielt. Die Partikelfraktion des Rohextrakts von P.facilis nahm in einer Stunde ca. 13 000 µl H_2/mg Protein auf. Die Enzyme waren im partikelgebundenen Zustand und bei 4°C unter H_2 sehr stabil.

3. Für die A.eutrophus-Stämme H16, B19, N9A und G27 konnte sowohl eine partikelgebundene als auch eine lösliche, NAD-reduzierende Hydrogenase nachgewiesen werden. Die löslichen Hydrogenasen von B19 und N9A ließen sich durch FMN drei- bzw. zweifach stimulieren. Der FMN-Einfluß auf die Enzyme von H16 und G27 (bis zu 20% Aktivierung) war dagegen gering.

4. Die löslichen Hydrogenasen der verschiedenen A.eutrophus-Stämme unterschieden sich vor allem hinsichtlich ihres Stabilitätsverhaltens. Die Enzyme von B19, N9A und G27 waren sehr sauerstoffempfindlich und während der Aufbewahrung auf eine H_2-Atmosphäre angewiesen. Das Enzym von H16 dagegen war O_2-unempfindlich und im oxidierten Zustand stabil. Die Gegenwart von H_2 und noch mehr der reduzierende Einfluß von NADH und Reduktionsmitteln führten zu einer außergewöhnlichen Destabilisierung der Hydrogenase.

5. Die lösliche Hydrogenase von H16 wurde mit 20%iger Ausbeute 68fach bis zu einer spezifischen Aktivität von 54 000 E/g Protein angereichert. Nach dem Kriterium der Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese war das Enzym homogen.

6. Im oxidierten Zustand lag die Hydrogenase in einer nicht reaktionsfähigen Enzymform vor, die ihren Ausdruck fand in einer NAD-Reduktionsanlaufphase und in der Unfähigkeit, mit anderen H-Acceptoren als NAD auch in Abwesenheit reduzierender Agenzien reagieren zu können. Die Hydrogenase konnte durch Reduktion reaktiviert werden. Physiologischer Reaktivator war NADH, das aber durch NADH-Strukturanaloge und Reduktionsmittel ersetzt werden konnte. NAD begünstigte die inaktive Enzymform und verzögerte den Vorgang der Reaktivierung.

7. Das pH-Optimum für die katalytische Aktivität der Hydrogenase lag bei 8,0. Als Temperaturoptimum wurde 33°C ermittelt. Die Aktivierungsenergie für die NAD-Reduktion betrug 14 kcal/mol. Das Aktivitätsoptimum wurde in 50 mM Tris-HCl-Puffer erreicht. Hohe Konzentration von Salzen, insbesondere Natriumsalzen wirkten aktivitätshemmend.

8. Ein Bedürfnis an locker gebundenen, dissoziablen Cofaktoren konnte nicht festgestellt werden. Dagegen wurden mit Hilfe spektrophotometrischer Methoden Eisen und Flavin als festgebundene Bestandteile der Hydrogenase nachgewiesen. Das gereinigte Enzym zeigte ein für Nichthämeisenproteine charakteristisches Absorptionsspektrum mit Maxima (Schultern) bei 420 und 380 nm. Die Flavinkomponente, die mittels einer TCA-Fällung aus dem Enzym extrahiert werden konnte, wies ausgeprägte, flavintypische Absorptionsbanden bei 447 und 375 nm auf und fluoreszierte in einem Wellenlängenbereich um 526 nm.

9. Die reaktivierte Hydrogenase vermochte ein weites Spektrum von künstlichen und physiologischen Wasserstoffacceptoren

zu reduzieren, unabhängig von einer NAD-Reduktion als vorausgehendem Primärschritt oder der Gegenwart eines zugesetzten, vermittelnden Elektronenüberträgers. Mit Ferricyanid als Acceptor wurden bis zu fünffach höhere H_2-Aufnahmeraten (350 000 µl H_2/Std·mg Hydrogenase) erzielt als mit NAD selbst. Das Flavin als wasserstoff- und elektronenübertragender Cofaktor und die Fähigkeit, auch NAD(P)H als H-Donatoren zu nutzen, verliehen der Hydrogenase multifunktionelle Eigenschaften: Neben der eigentlichen Hydrogenaseaktivität besaß das Enzym auch Diaphorase- und NAD(P)H-oxidase-Aktivität. Die Reversibilität der NAD-Reduktion und die H_2-Entwicklung aus reduziertem MV und BV konnte manometrisch demonstriert und mit Hilfe gaschromatographischer Analyse auch qualitativ nachgewiesen werden. Unter geeigneten reduzierenden Bedingungen betrug die Rate der H_2-Entwicklung aus NADH ca. 1/40 (1610 µl H_2/Std·mg Hydrogenase) der NAD-Reduktionsrate.

10. Folgende Michaeliskonstanten konnten ermittelt werden: $K_m^{H_2}$ = 0,25 mM; K_m^{NAD} = 0,65 mM; K_m^{FC} = 0,2 mM; K_m^{NADH} = 0,08 mM; K_m^{NAPH} = 6,4 mM. Reduzierung der Hydrogenase und Gegenwart von NADH führten zu negativer Kooperativität, deren Ausprägung mit Erhöhung des Reduktionsgrades des Enzyms zunahm. In Gegenwart von 0,4 mM NADH wurden Hill-Koeffizienten von n = 0,28 (H_2-Sättigung) und n = 0,82 (NAD-Sättigung) bestimmt.

11. Die Hydrogenase wurde durch Schwermetallsalze und p-CMB sehr stark gehemmt. p-CMB übte gegenüber NAD eine kompetitive (K_i = 0,025 mM) und gegenüber H_2 eine nichtkompetitive Hemmung aus. Das bedeutet, daß mindestens eine SH-Gruppe an der Bindung von NAD beteiligt ist. Metallkomplexbildner hemmten die Hydrogenase nicht.

12. Die Hydrogenase ist ein Enzym mit einem Molekulargewicht von 205 000 Dalton. Die Untereinheitenstruktur ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Als Isoelektrischer Punkt der Hydrogenase wurde ein pH-Wert von 4,85 ermittelt.

LITERATURVERZEICHNIS

AASA, R. MALMSTRÖM, B.G. SALTMANN, P. VÄNNEGARD, N.	1963	The specific binding of iron (III) and copper (II) to transferrin and conalbumin. Biochim. Biophys. Acta 75, 203-222
ACKRELL, B.A.C. ASATO, R.N. MOWER, H.F.	1966	Multiple forms of bacterial hydrogenases. J. Bact. 92, 828-838
AGGAG, M. SCHLEGEL, H.G.	1973	Studies on a gram-positive hydrogen bacterium, Nocardia opaca strain 1b. I. Description and physiological characterization. Arch. Microbiol. 88, 299-318
AGGAG, M. SCHLEGEL, H.G.	1974	Studies on a gram-positive hydrogen bacterium, Nocardia opaca 1b. III. Purification, stability and some properties of the soluble hydrogen dehydrogenase. Arch. Microbiol. 100, 25-39
AHRENS, J. SCHLEGEL, H.G.	1966	Zur Regulation der NAD-abhängigen Hydrogenase-Aktivität. Arch. Mikrobiol. 55, 257-265
ALEEM, M.J.H. LEES, H. NICHOLAS, D.J.D.	1963	ATP-dependent reduction of NAD by ferro-cytochrom c in chemoautotrophic bacteria. Nature 200, 759-761
ALEMAN, V. SMITH, S.T. RAJAGOPALAN, K.V. HANDLER, P.	1965	Soluble metalloflavoproteins. In: Non-heme iron proteins: Role in energy conversion, S. 327-348. Hrsg. A. San Pietro; The Antioch Press; Yellow Springs, Ohio

ANDREESEN, M.
SCHLEGEL, H.G. 1974 A new coryneform hydrogen bacterium: Corynebacterium autotrophicum strain 7c.
II. Isolation of a slime-free mutant.
Arch. Microbiol. 100, 351-361

ANDREWS, P. 1964 Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration.
Biochem. J. 91, 222-233

ATKINSON, D.E.
MC FADDEN, B.A. 1954 The biochemistry of Hydrogenomonas. I. The hydrogenase of H. facilis in cell-free preparations.
J. Biol. Chem. 210, 885-893

BANERJEE, A.K.
SCHLEGEL, H.G. 1966 Zur Rolle des Hefeextraktes während des chemolithotrophen Wachstums von Micrococcus denitrificans.
Arch. Microbiol. 53, 132-153

BEINERT, H. 1965 EPR spectroscopy in the detection, study, and identification of proteinbound non-heme iron.
In: Non-heme iron proteins: Role in energy conversion, S. 23-42. Hrsg. A. San Pietro; The Antioch Press; Yellow Springs, Ohio

BEISENHERZ, G.
BOLZE, H.J.
BÜCHER, T.
CZOK, R.
GARBADE, K.H.
MEYER-ARENDT, E.
PFLEIDERER, G. 1953 Diphosphofructose-Aldolase, Phosphoglyceraldehyd-Dehydrogenase, Milchsäure-Dehydrogenase, Glycerophosphat-Dehydrogenase und Pyruvat-Kinase aus Kaninchenmuskulatur in einem Arbeitsgang.
Z. Naturf. 8B, 555-577

BERGMEYER, H.U. 1955 Zur Messung von Katalase-Aktivitäten.
Biochem. Z. 327, 255-258

BERNSTEIN, S.
VISHNIAC, W. 1959 Purification and properties of a DPN-linked hydrogenase. Federat. Proc. 18, 192

BESSEY, O.A.
LOWRY, O.H.
LOVE, R.H. 1949 The fluorometric measurement of the nucleotids of riboflavin and their concentration on tissues. J. Biol. Chem. 180, 755-760

BONE, D.H. 1960 Localization of H_2 activating enzymes in P. saccharophila. Biochem. Biophys. Res. Comm., 3, 211-214

BONE, D.H. 1963 Inhibitor, isotopic and kinetic studies on hydrogen dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 67, 589-598

BONE, D.H.
BERNSTEIN, S.
VISHNIAC, W. 1963 Purification and some properties of different forms hydrogen-dehydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 67, 581-588

BOSE, S.K.
GEST, H. 1962 Hydrogenase and light-stimulated electron transfer reactions in photosynthetic bacteria. Nature 195, 1168-1170

BROWN, N.C.
ELIASSON, R.
REICHARD, P.
THELANDER, L. 1968 Nonheme iron as a cofactor in ribonucleotid reduktase from E.coli. Biochem. Biophys. Res. Comm., 30, 522-527

BULLER, C.S.
AKAGI, J.M. 1964 Hydrogenase of Coleman's sulfate-reducing bacterium. J. Bact. 88, 440-443

CHANCE, B.
HOLLUNGER, G. 1967 Succinate-linked pyridine nucleotide reduction in mitochondria. Fed. Proc. 16, 163

CHEN, J.S.
MORTENSON, L.E. 1974 Purification and properties of hydrogenase from Clostridium pasteurianum W 5. Biochim. Biophys. Acta 371, 283-298

CONWAY, A.
KOSHLAND, Jr., D.E. 1968 Negative cooperativity in enzyme action. The binding of diphosphopyridine nucleotide to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochemistry 7, 4011-4023

DALTON, H.
MORRIS, J.A.
WARD, M.A.
MORTENSON, L.E. 1971 Purification and some properties of molybdoferredoxin, a component of nitrogenase from Clostridium pasteurianum. Biochemistry 10, 2066-2072

DIXON, M. 1953 The determination of enzyme inhibitor constants. Biochem. J. 55, 170-171

DIXON, M. 1971 The acceptor specifity of flavins and flavoproteins. III. Flavoproteins. Biochim. Biophys. Acta 226, 269-284

DOY, C.H. 1968 The nature of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase in extracts of wild-type Neurospora crassa: A reaction controlled by two activating substrates and three allostric negative modifiers. Biochim. Biophys. Acta 159, 352-366

EBERHARDT, U. 1965 Über das Wasserstoff aktivierende System bei Hydrogenomonas H16. Dissertation Göttingen

EBERHARDT, U. 1966 Über das wasserstoffaktivierende System bei Hydrogenomonas H16. I. Verteilung der Hydrogenase-Aktivität auf zwei Zellfraktionen. Arch. Mikrobiol. 53, 288-302

EBERHARDT, U. 1971 The cell wall as the site of carotenoid in the "knallgas" bacterium, 12/60/x. Arch. Mikrobiol. 80, 32-37

EISELE, B. WALLENFELS, K. 1970 The stereoselective inhibition of functional SH groups of dehydrogenases. In: Pyridine nucleotide dependent dehydrogenases, S. 91-101. Hrsg. H. Sund; Springer-Verlag, Berlin

FARKAS, L. FISCHER, E. 1947 On the activation of molecular hydrogen by Proteus vulgaris. J. Biol. Chem. 167, 787-805

FINDLEY, J.E. AKAGI, J.M. 1968 Lysis of Desulfovibrio vulgaris by ethylene diaminetetraacetic acid and lysozyme. J. Bact. 96, 1427-1428

FISHER, H.F. KRASNA, A.I. RITTENBERG, D. 1954 The interaction of hydrogenase with oxygen. J. Biol. Chem. 209, 569-578

FRIEDRICH, C.G. SCHLEGEL, H.G. 1975 Aromatic amino acid biosynthesis in Alcaligenes eutrophus H16. I. properties and regulation of DAHP-Synthase. Arch. Microbiol. 103, 133-140

FRY, K.T. SAN PIETRO, A. 1962 Studies on photosynthetic pyridine nucleotide reductase. Biochem. Biophys. Res. Comm. 9, 218-225

GEST, H. 1952 Properties of cell-free hydrogenases of E.coli and R.rubrum. J. Bact. 63, 111-121

GRAY, C.T.
GEST, H. 1965 Biological formation of molecular hydrogen. Science 148, 186-192

GUPTA, N.K.
VENNESLAND, B. 1964 Glyoxylate carboligase of Escherichia coli: A flavoprotein. J. Biol. Chem. 239, 3787-3789

HALL, D.O.
CAMMACK, R.
RAO, K.K. 1974 The iron-sulphur proteins: Evolution of a ubiquitous protein from model systems to higher organisms. Origins of Life 5, 363-386

HASCHKE, R.H.
CAMPBELL, L.L. 1971 Purification and properties of a hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris. J. Bact. 105, 249-258

HEDRICK, J.L.
SMITH, A.J. 1968 Size and charge isomerseperation and estimation of molecular weights of protein by disc gel electrophoresis. Arch. Biochem. Biophys. 126, 155-164

HOBERMANN, H.
RITTENBERG, D. 1943 Biological catalysis of the exchange reaction between water and hydrogen. J. Biol. Chem. 147, 211-227

HÖPNER, T.
TRAUTWEIN, A. 1972 Some properties of formate dehydrogenase. Z. Naturforsch. 27b, 1075-1076

v. HUGO, H. 1973 Der Einfluß von Wasserstoff auf die Pyruvatvergärung und die physiologische Bedeutung der 1-Phosphofructokinase bei saccharolytischen Clostridien. Dissertation, Göttingen

HYNDMAN, L.A.
BURRIS, R.H.
WILSON, P.W. 1953 Properties of hydrogenase from Azotobacter vinelandii. J. Bact. 65, 522-531

JOKLIK, W.K. 1950 The hydrogenase of Escherichia coli in the cell-free state. I. Concentration, properties and activation. Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci. 28, 321-329

KASERER 1906 Die Oxydation des Wasserstoffs durch Mikroorganismen. Zbl. Bakt. II. Abt. 16, 681-696

KERESZTES-NAGY, S. MARGOLIASH, E. 1966 Preparation and characterization of Alfalfa ferredoxin. J. Biol. Chem. 241, 5955-5966

KING, N.K. WINFIELD, M. 1955 The assay of soluble hydrogenase. Biochim. Biophys. Acta 18, 431-432

KING, T.E. 1963 Reconstitution of respiratory chain enzyme systems. XII. Some observations on the reconstitution of the succinate oxidase system from heart muscle. J. Biol. Chem. 238, 4037-4051

KINSKY, S.C. 1959 Hydrogen oxidation by Clostridium kluyveri. J. Biol. Chem. 234, 973-978

KINSKY, S.C. STADTMAN, E.R. MACLAY, H.K. 1961 Cofaktor requirements for pyridine nucleotide reduction by hydrogen. J. Biol. Chem. 236, 574-579

KLEMME, J.H. 1969 Studies on the mechanism of NAD-photoreduction by chromatophores of the facultative phototroph Rhodopseudomonas capsulata. Z. Naturforschg. 24b, 67-76

KLEMME, J.H. 1972 Allosterisch regulierte und nicht regulierte Pyrophosphat -Phosphohydrolasen aus phototrophen Bakterien. Habilitationsschrift, Göttingen

KLEINER, D.
BURRIES, R.H.
1970 The hydrogenase of C.pasteurianum: Kinetic studies and the role of molybdenum.
Biochim. Biophys. Acta 212, 417-427

KÖNIG, R.
STEGEMANN, H.
FRANCKSEN, H.
PAUL, H.L.
1970 Protein subunits in the potato virus x group. Determination of the molecular weights by polyacrylamid electrophoresis.
Biochim. Biophys. Acta 207, 184-189

KOSHLAND, Jr.,D.E.
1958 Application of a theory of enzyme specifity to protein synthesis.
Proc. Natl. Acad. Sci. US 44, 98-104

KOSHLAND, Jr.,D.E.
NEMETHY, G.
FILMER, D.
1966 Comparison of experimental binding data and theoretical models in proteins containing subunits.
Biochemistry 5, 365-385

KRASNA, A.I.
RITTENBERG, D.
1954 The mechanism of action of the enzyme hydrogenase.
J. Americ. Chem. Soc. 76, 3015-3020

KÜHNEMUND, H.
1971 Zur Verwertung von molekularem Wasserstoff durch Micrococcus denitrificans.
Dissertation, Göttingen

KURATA, Y.
1962 On the appearance of hydrogenase, nitrate reductase and aspartase during the ontogeny of the frog.
Exptl. Cell. Res. 28, 424-429

LEHNINGER, A.L.
1970 Bioenergetik. Molekulare Grundlagen der biologischen Energieumwandlung.
G. Thieme Verlag, Stuttgart

LEHNINGER, A.L.
1972 Biochemistry. The molecular basis of sell structure and function.
Worth publishers, Inc.

LEGALL, J.
DERRARTANIAN, D.V.
SPILKER, E.
LEE, J.P.
PECK, Jr., H.D.
1971 Evidence for the involvement of non-heme iron in the active site of hydrogenase from Desulfovibrio vulgaris.
Biochim. Biophys. Acta 234, 525-530

LEMBERG, R.
BARRETT, J.
1973 Cytochromes, S. 39-42.
Academic Press; London, New York

LOWRY, O.H.
ROSEBROUGH, N.J.
FARR, A.L.
RANDALL, R.J.
1951 Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265-275

LEVITZKI, A.
KOSHLAND,Jr., D.E.
1969 Negative cooperativity in regulatory enzymes.
Proc. Nat. Acad. Sci.US. 62, 1121-1128

LIU, C.Y.
WEBSTER, D.A.
1974 Spectral characteristics and interconversions of the reduced, oxidized, and oxygenated forms of purified cytochrome o.
J. Biol. Chem. 249, 4261-4266

LOVENBERG, W.
1973 Iron-sulfur-proteins, Vol. I and II.
Academic Press; New York, London

LOVENBERG, W.
BUCHANAU, B.B.
RABINOWITZ, J.C.
1963 Studies on the chemical nature of Clostridial ferredoxin.
J. Biol. Chem. 238, 3899-3913

MAENO, H.
1967 Spectral studies on the catalytic mechanism and activation of Pseudomonas tryptophan-oxygenase (tryptophan pyrrolase).
J. Biol. Chem. 242, 596-601

MALKIN, R. 1973 The chemical properties of ferredoxin.
In: Iron-sulfur proteins, S. 1-26.
Hrsg. W. Lovenberg; Academic Press,New York, London

MALKIN, R.
RABINOWITZ, J.C. 1967 The reactivity of clostridial ferredoxin with iron chelating agents and 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid.
Biochemistry 6, 3880-3891

MARTIN, R.G.
AMES, B.N. 1961 A method for determining the sedimentation behavior of enzymes: Application to protein mixtures.
J. Biol. Chem. 236, 1372-1379

MAURER, H.R. 1968 Disk-Elektrophorese - Theorie und Praxis der diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
De Gruyter & Co., Berlin

MONOD, J.
WYMAN, J.
CHANGEUX, J.P. 1965 On the nature of allosteric transitions: a plausible model.
J. Mol. Biol. 12, 88-118

MOORE, E.C.
REICHARD, P.
THELANDER, L. 1964 Enzymatic synthesis of desoxyribonucleotides.
V. Purification and properties of thioredoxin reductase from Escherichia coli B.
J. Biol. Chem. 239, 3445-3452

MORTENSON, L.E.
CHEN, J.S. 1974 Hydrogenase.
In: Microbial iron mechanism, S. 231-282.
Academic Press; New York, London

MORTENSON, L.E.
NAKOS, G. 1973 Bacterial ferredoxins and/or iron-sulfur proteins as electron carriers.
In: Iron-sulfur proteins, Vol.I. S. 37-63
Academic Press; New York, London

MULTANI, J.S.
MORTENSON, L.E. 1972 Circular dichroism spectra of hydrogenase from Clostridium pasteurianum W 5.
Biochim. Biophys. Acta 256, 66-70

MYER, Y.P. 1972 The "oxygenated complex" of cytochrome c oxidase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 49, 1194-1200

NAKOS, G.
MORTENSON, L. 1971a Purification and properties of hydrogenase, an iron sulfur protein, from C.pasteurianum W5.
Biochim. Biophys. Acta 227, 576-583

NAKOS, G.
MORTENSON, L.E. 1971b Structural properties of hydrogenase from C.pasteurianum W5.
Biochemistry 10, 2442-2449

NAGAMI, K. 1972 The participation of a sulfhydryl group in the binding of iron to pyrocatechase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 803-807

NOZAKI, M. 1974 Nonheme iron dioxygenase.
In: Molecular mechanisms of oxygen activation, S. 135-165. Hrsg. O. Hayaishi, Academic Press; New York, London

OKUNUKI, K.
HAGIHARA, B.
SEKUZU, J.
HORIO, T. 1958 Proceedings of the international symposium on enzyme chemistry, Tokyo & Kyoto, 1957, S. 264-272.
Pergamon Press, London

PACKER, L.
VISHNIAC, W. 1955 The specifity of a diphosphopyridine nucleotide linked hydrogenase.
Biochim. Biophys. Acta 17, 153

PALMER, G.
MASSEY, V. 1968 Mechanisms of flavoprotein catalysis.
In: Biological oxidations, S. 264-301.
Hrsg. T.P. Singer; Inter science

PECK, H.D.
GEST, H. 1957 Formic dehydrogenase and the hydrogenlyase enzyme complex in coli-aerogenes bacteria.
J. Bact. 73, 706-721

PETERING, D.H.
PALMER, G. 1967 The reversible denaturation of spinach ferredoxin.
Fed. Proc. 26, 731

PETERING, D.
FEE, J.A.
PALMER, G. 1971 The oxygen sensitivity of spinach ferredoxin and other iron-sulfur proteins. The formation of protein-bound sulfur-zero.
J. Biol. Chem. 246, 643-653

PFENNIG, N.
LIPPERT, K.D. 1966 Über das Vitamin B12-Bedürfnis phototropher Schwefelbakterien.
Arch. Mikrobiol. 55, 245-256

PFITZNER, J.
LINKE, H.A.B.
SCHLEGEL, H.G. 1970 Eigenschaften der NAD-spezifischen Hydrogenase aus Hydrogenomonas H16.
Arch. Mikrobiol. 71, 67-78

PLAPP, B.V.
WOENCKHAUS, C.
PFLEIDERER, G. 1968 Evaluation of N-(ω-Bromoacetamidoalkyl)nicotinamides as inhibitors of dehydrogenases.
Arch. Biochem. Biophys. 128, 360-368

PROBST, I. 1975 Untersuchungen über das Elektronentransport-System von Alcaligenes eutrophus Stamm H16.
Dissertation, Göttingen

PULLMANN, M.E.
PENEFSKY, H.S.
DATTA, A.
RACKER, E. 1960 Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation.
I. Purification and properties of soluble dinitrophenol-stimulated ATPase.
J. Biol. Chem. 235, 3322-3329

RABIN, B.R.
WHITEHEAD, E.P. 1962 Mechanism of action of yeast alcohol dehydrogenase. Nature 196, 658-660

RACKER, E. 1947 Spectrophotometric measurements of hexokinase and phosphohexokinase activity. J. Biol. Chem. 167, 843-854

RAJAGOPALAN, K.V.
HANDLER, P. 1964 Hepatic aldehyde oxidase II. Differential inhibition of electron transfer to various electron acceptors. J. Biol. Chem. 233, 2020-2022

RENWICK, G.M.
GIUMARRO, C.
SIEGEL, S.M. 1964 Hydrogen metabolism in higher plants. Plant Physiol. 39, 303-306

REPASKE, R. 1962 The electron transport system of Hydrogenomonas eutropha. I. Diphosphopyridine nucleotide reduction by hydrogen. J. Biol. Chem. 237, 1351-1355

REPASKE, R.
DANS, C.L. 1968 A factor for coupling NAD to hydrogenase in Hydrogenomonas eutropha. Biochim. Biophys. Res. Comm. 30, 136-141

REYNOLDS, J.A.
TANFORD, C. 1970 The gross-conformation of proteinsodium dodecylsulfate complexes. J. Biol. Chem. 245, 5161-5165

RINGLER, R.L.
MINAKANI, S.
SINGER, T.P. 1963 Studies on the respiratory chain-linked reduced nicotinamid adenine dinucleotide dehydrogenase. II. Isolation and molecular properties of the enzyme from beef heart. J. Biol. Chem. 238, 801-810

RITTENBERG 1957 Some properties of the enzyme hydrogenase. In: Proceedings of the international symposium on enzyme chemistry, S. 256-260. Tokyo and Kyoto

RUDOLPH, R. 1968 Kulturgefäße zur Anzucht von Hydrogenomonas H16 mit elektrolytischer Knallgaserzeugung. Dissertation, Göttingen

SADANA, J.C. JAGANNATHAN, A.V. 1956 Purification and properties of the hydrogenase of Desulfovibrio desulfuricans. Biochim. Biophys. Acta 14, 440

SAN PIETRO, A. 1955 Assay and properties of hydrogenases. In: Methods in Enzymology II, S. 861-870. Hrsg. S.P. Colowick und N.O. Kaplan; Academic Press, New York

SAN PIETRO, A. 1965 Non-heme iron proteins: Role in energy conversion. The Antioch Press; Yellow Springs, Ohio

SCHACHMANN, H.K. 1959 Ultracentrifugation in biochemistry. Academic Press; New York, London

SCHATZ, A. BOVELL, C. 1952 Growth and hydrogenase activity of a new bacterium, Hydrogenominas facilis. J. Bact. 63, 87-98

SCHLEGEL, H.G. KALTWASSER, H. GOTTSCHALK, G. 1961 Ein Submersverfahren zur Kultur wasserstoffoxidierender Bakterien: Wachstumsphysiologische Untersuchungen. Arch. Mikrobiol. 38, 209-222

SCHNEIDER, K.
RUDOLPH, V.
SCHLEGEL, H.G. 1973 Description and physiological characterization of a coryneform hydrogen bacterium, strain 14g.
Arch. Microbiol. 93, 179-193

SCHUSTER, E. 1967 Chemolithotrophes Wachstum von Hydrogenomonas H16 im Chemostaten mit elektrolytischer Knallgaserzeugung.
Dissertation, Göttingen

SHAPIRO, A.L.
VINUELA, E.
MAIZEL Jr., I.V. 1967 Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 28, 815-820

SHUG, A.L.
HAMILTON, P.B.
WILSON, P.W. 1956 Hydrogen and nitrogen fixation.
In: Inorganic nitrogen metabolism, S. 344.
Hrsg. W.D. Mc Elroy und B. Glass; The Johns Hopkins Press, Baltimore

SIEBERT, D. 1969 Über propanverwertende, wasserstoffoxidierende Bakterien und die Charakterisierung eines Förderungsfaktors.
Dissertation, Göttingen

SINGER, T.P.
KEARNEY, E.B.
BERNATH, P. 1956 Studies on succinic dehydrogenase II. Isolation and properties of the dehydrogenase from beef heart.
J. Biol. Chem. 223, 599-613

SÖRENSEN, S.P.L. 1909 Über die Messung und die Bedeutung der Wasserstoffionenkonzentration bei enzymatischen Prozessen.
Biochem. Z. 21, 131-304

STEGEMANN, H. 1972 Apparatur zur thermokonstanten Elektrophorese und Fokussierung und ihre Zusatzteile.
Z. Anal. Chemie 261, 388-391

STEPHENSON, M.
STICKLAMD, L.H. 1931 Hydrogenase: Bacterial enzyme activating molecular hydrogen. I. The properties of enzymes. Biochem. J. 25, 205-214

TAMIYA, N.
YAMAGUCHI, Y.
HONYA, M.
YAGI, T. 1966 The electron carrier specifities of the hydrogenases of different origins. Biochem. Biophys. Res. Comm. 22, 43-47

TEIPEL, J.
KOSHLAND,Jr., D.E. 1969 The significance of intermediary plateau regions in enzyme saturation curves. Biochemistry 8, 4656-4663

TEMPERLI, A.
PENGRA, R.M.
WILSON, P.W. 1960 Some properties of a soluble and particle-bound hydrogenase in Aerobacter aerogenes. Biochim. Biophys. Acta 38, 557-558

TUNAIL, N. 1973 Charakterisierung des Wasserstoffbakteriums Arthrobacter 7c und der Regulation des Kohlenhydratstoffwechsels. Dissertation, Göttingen

TUNAIL, N.
SCHLEGEL, H.G. 1974 A new coryneform hydrogen bacterium: Corynebacterium autotrophicum strain 7c. I. Characterization of the wild type strain. Arch. Microbiol. 100, 341-350

TZENG, S.F.
WOLFE, R.S.
BRYANT, M.P. 1975 Factor 420-dependent pyridine nucleotide-linked hydrogenase system of Methanobacterium ruminantium. J. Bact. 121, 184-191

VALENTINE, R.C.
MORTENSON, L.E.
CARNAHAN, J.E. 1963 The hydrogenase system of Clostridium pasteurianum. J. Biol. Chem. 238, 1141-1144

VALLEE, B.L.
WACKER, W.E.C.
1970 Metalloproteins.
In: The Proteins, Bd. V.
Hrsg. H. Neurath;
Academic Press; New York,
London

VAN'T RIET, J.
PLANTA, R.J.
1975 Purification, structure and properties of the respiratory nitrate reductase of Klebsiella aerogenes.
Biochim. Biophys. Acta 379, 81-94

VILLAFRANCA, J.J.
MILDVAN, A.S.
1971 The mechanism of aconitase action. I. Preparation, physical properties of the enzyme and activation by iron(II).
J. Biol. Chem. 246, 772-779

WARBURG, O.
CHRISTIAN, W.
1942 Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase.
Biochem. Z. 310, 384-421

WEBB, J.L.
1966 Enzyme and metabolic inhibitors, Vol. II.
Academic Press; New York, London

WEBER, K.
OSBORN, M.
1969 The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis.
J. Biol. Chem. 244, 4406-4412

WEBER, K.
PRINGLE, J.R.
OSBORN, M.
1972 Measurements of molecular weights by electrophoresis on SDS-acrylamide gels.
In: Methods in Enzymology, Vol. XXVI, S. 3-27.
Hrsg. C.H.W. Hirs und S.N. Timasheff;
Academic Press; New York

WILDE, E.
1962 Untersuchungen über Wachstum und Speichersynthese von Hydrogenomonas.
Arch. Mikrobiol. 43, 109-137

WITTENBERG, J.B.
NOBLE, R.W.
WITTENBERG, B.A.
ANTONINI, E.
BRUNORI, M.
WYMAN, J.
1967 Studies on the equilibria and kinetics of the reactions of peroxidase with ligands. II. The reaction of ferroperoxidase with oxygen. J. Biol. Chem. 242, 626-634

WITTENBERGER, H.
REPASKE, R.
1961 Studies on hydrogen in cell-free extracts of Hydrogenomonas eutropha. Biochim. Biophys. Acta 47, 542-552

YOSHIDA, K.
NAKAMURA, T.
1973 Studies of luciferase from Photobacterium phosphoreum. IV. Preparation and properties of stripped luciferase. J. Biochem. 74, 915-922

Herrn Prof. Dr. H. G. Schlegel möchte ich für die Betreuung dieser Arbeit und die mir immer gern gewährte Unterstützung herzlich danken.

Frau Dr. B. Friedrich und Herrn Dr. C. Friedrich danke ich für viele hilfreiche Ratschläge und methodische Hinweise.

Herrn R. Jüttner möchte ich danken für die Behilflichkeit bei der Durchführung der gaschromatographischen Messungen.

Für die Überlassung einer Probe gereinigten Ferredoxins aus Clostridium pasteurianum danke ich Herrn Dr. T. Schwan.

LEBENSLAUF

Am 19.12.1944 wurde ich in Naumburg/Saale geboren.
Nach Absolvierung der Grundschule in Heringen/Werra besuchte ich in Kassel das Wilhelmsgymnasium, wo ich im Februar 1966 die Reifeprüfung ablegte.
Im Sommersemester 1966 begann ich an der Justus-Liebig-Universität Gießen mit dem Studium der Biologie. Um das Schwergewicht auf das Fach Mikrobiologie legen zu können, setzte ich mein Studium im Sommersemester 1969 an der Georg-August-Universität Göttingen fort. Im Februar 1972 absolvierte ich die Diplom-Hauptprüfung mit Mikrobiologie als Hauptfach und organischer Chemie und Biochemie als Nebenfächer. Anschließend fertigte ich die Diplomarbeit "Physiologische und biochemische Charakterisierung eines neuen carotinoidhaltigen Wasserstoffbacteriums" an. Im Januar 1973 begann ich mit den experimentellen Arbeiten zu der vorliegenden Dissertation.